

# **Die Protein-Phosphatase Typ1 $\gamma$ 1 in der Retina – Identifizierung und subzelluläre Lokalisierung**

Dissertation  
zur  
Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)

dem  
  
Fachbereich Pharmazie  
der Philipps-Universität Marburg  
vorgelegt von

**Andreas Grummann  
aus Varel/Oldenburg**

Marburg/Lahn 2000

Vom Fachbereich Pharmazie  
der Philipps-Universität Marburg  
als Dissertation am 20.9.2000 angenommen.

Erstgutachter: Frau Prof. Dr. Susanne Klumpp  
Zweitgutachter: Herr Prof. Dr. Uwe Wolfrum

Tag der mündlichen Prüfung: 21.9.2000

An dieser Stelle bedanke ich mich bei allen Kollegen, Freunden und Verwandten, die mich in den Jahren meiner Promotion unterstützt und so zum Gelingen meiner Arbeit beigetragen haben. Besonders danke ich:

Frau Professor Dr. Susanne Klumpp, der ich aufgrund des interessanten Themas eine ausgezeichnete wissenschaftliche Ausbildung auf einem hochaktuellen Gebiet der Biochemie verdanke.

Herrn Professor Dr. Uwe Wolfrum, Institut für Zoologie in Mainz, der mir im Rahmen einer sehr guten Kooperation mit zahlreichen wissenschaftlichen Diskussionen faszinierende Einblicke in die Zellbiologie ermöglichte.

Dagmar Selke, Jan Hermesmeier, Karin Rose und Gunther Bechmann, mit denen mich eine gute und weit mehr als nur berufliche Zusammenarbeit verband.

Herrn Dr. Roland Kellner, Merck, der die isolierten Proteine teilsequenzierte.

Mein größter Dank gilt meiner Familie, ohne deren Unterstützung Studium und Promotion nicht möglich gewesen wären und meiner Freundin Claudia für den Rückhalt, den sie mir während der gesamten Promotionszeit gegeben hat.



# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>9</b>
<b>2</b>	<b>Einleitung</b>	<b>10</b>
2.1	Protein-Phosphatasen	10
2.2	Die Protein-Phosphatase Typ 1	11
2.3	Die Protein-Phosphatase Typ 1 in der Retina der Säugetiere	16
<b>3</b>	<b>Materialien</b>	<b>19</b>
3.1	Geräte und Verbrauchsmaterialien	19
3.2	Chemikalien	20
3.3	Antikörper	21
3.4	Puffer	23
3.4.1	Gewinnung des Schüttelüberstandes der Retinae	23
3.4.2	Präparation der Außensegmente/des Cilienapparates	23
3.4.3	Batch-Verfahren/Gelfiltration	23
3.4.4	Elektrophorese	24
3.4.5	Western-Blot	25
3.4.6	Detektion glykosylierter Proteine	25
3.4.7	Immunhistochemie	25
<b>4</b>	<b>Methoden</b>	<b>26</b>
4.1	Gewinnung des Schüttelüberstandes der Retinae	26
4.2	Präparation subzellulärer Bereiche der Photorezeptorzellen	26
4.2.1	Präparation der Retinae	26
4.2.2	Präparation der Außensegmente	27
4.2.3	Extraktion des Cilienapparates	28
4.3	Aufreinigung im Batch-Verfahren	28

4.4	Gelfiltration	30
4.5	Proteinbestimmung	30
4.6	Proteinkonzentrierung	31
4.6.1	Methanol-Aceton Fällung	31
4.6.2	Ultrafiltration	31
4.7	Dialyse	31
4.8	Elektrophoretische Methoden	32
4.8.1	Denaturierende Gelelektrophorese	32
4.8.2	Native Gelelektrophorese	33
4.8.3	Zweidimensionale Gelelektrophorese	34
4.8.4	Semidry-Blotting	36
4.9	Proteindetektion	37
4.9.1	Coomassie-Färbung	37
4.9.2	Silberfärbung	37
4.9.3	Ponceau S-Färbung	38
4.9.4	Western-Blot	38
4.9.5	Detektion von Glykoproteinen	39
4.10	Immunpräzipitation	40
4.11	Immunhistochemie	41
<b>5</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>42</b>
5.1	Detektion retinaler PP1 $\gamma$ 1 im Western-Blot	44
5.2	Nachweis von Komplexen der PP1 $\gamma$ 1	48
5.3	Actin als Bindungspartner der PP1 $\gamma$ 1?	51
5.4	Lokalisierung der PP1 $\gamma$ 1 in der Retina	52
5.4.1	Immunhistochemische Lokalisierung der PP1 $\gamma$ 1 in der Retina	52
5.4.2	Subzelluläre Lokalisierung der PP1 $\gamma$ 1 in der Retina	54
5.5	Immunpräzipitation der PP1 $\gamma$ 1	56
5.6	Assoziation der PP1 $\gamma$ 1 mit dem Cytoskelett	60

5.7	Detektion der PP1 $\gamma$ l in der Außensegment-Präparation	61
5.8	Reinigung eines vom PP1 $\gamma$ -Antikörper detektierten 68 kDa-Proteins	62
5.8.1	Gelfiltration	62
5.8.2	Gelelektrophoretische Aufreinigung	64
5.8.2.1	Native Gelelektrophorese	65
5.8.2.2	Zweidimensionale Gelelektrophorese	66
5.9	Identifizierung der isolierten Proteine	69
5.10	Untersuchung der Modifikation von CRMP-1	72
<b>6</b>	<b>Diskussion</b>	<b>73</b>
6.1	Nachweis der PP1 $\gamma$ l in der Retina	73
6.2	Die PP1 $\gamma$ l als hochmolekularer Komplex in der Retina	74
6.3	Funktion der PP1 in der Retina	77
6.4	Aufreinigung von CRMP-1 und CRMP-2 aus der Retina	80
6.5	Ausblick	82
<b>7</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>84</b>
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>85</b>
<b>9</b>	<b>Anhang</b>	<b>97</b>





# 1 Abkürzungsverzeichnis

APS	Ammoniumperoxodisulfat
BSA	Rinderserumalbumin
CAPS	3-(Cyclohexylamino)-1-propansulfonsäure
CRMP	Collapsin response mediator protein
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamin-tetraessigsäure
EGTA	[Etylen-bis(oxyethylen-nitrilo)]-tetraessigsäure
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography
GTP	Guanosintriphosphat
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonsäure
HERT	HEPES-Based Earle's Ringer mit Taurin
2-ME	2-Mercaptoethanol
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphate-Buffered Saline
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PP1	Protein-Phosphatase Typ 1
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodium-Dodecylsulfat
TBST	TRIS-Buffered Saline mit Tween 20
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan

## 2 Einleitung

### 2.1 Protein-Phosphatasen

Die reversible Phosphorylierung von Proteinen an Serin-/Threonin- und Tyrosin-Resten durch Protein-Kinasen (PK) und Protein-Phosphatasen (PP) gehört zu den wichtigsten zellulären Regulationsmechanismen. Es wird davon ausgegangen, daß in eukaryontischen Zellen mindestens 30 % aller Proteine reversibel phosphoryliert werden, wobei über 99 % der Phosphorylierungen auf die Aminosäuren Serin und Threonin entfallen (Pinna und Donella-Deana, 1994; Barford, 1999).

Biochemisch werden die Serin-/Threonin-Phosphatasen nach Substratspezifität und Sensitivität gegenüber bestimmten Inhibitoren und Kationen-Abhängigkeit in zwei Klassen unterteilt. Während Typ-1 Protein-Phosphatasen (PP1) durch die hitzestabilen Proteine Inhibitor-1 und -2 gehemmt werden und bevorzugt die  $\beta$ -Untereinheit der Phosphorylase-Kinase dephosphorylieren, sind Typ-2 Protein-Phosphatasen nicht durch diese hitzestabilen Proteine hemmbar und bevorzugen die  $\alpha$ -Untereinheit der Phosphorylase-Kinase als Substrat. Typ-2 Protein-Phosphatasen können weiter unterteilt werden in Kationen-unabhängige (PP2A), Calcium-abhängige (PP2B = Calcineurin) und Magnesium-abhängige Phosphatasen (PP2C) (Ingebritsen und Cohen, 1983).

Strukturell lassen sich die Serin-/Threonin-Phosphatasen zwei Genfamilien zuordnen (neue Nomenklatur – die sich international nicht konsequent durchsetzen konnte – in Klammern): PP1 (PPP1), PP2A (PPP2) und PP2B (PPP3) stehen als Familie der Phosphoprotein-Phosphatasen (PPP-Familie) der PP2C (PPM1) als Mitglied der Magnesium-abhängigen Protein-Phosphatasen-Familie (PPM-Familie) gegenüber. Neu entdeckte Phosphatasen lassen sich in diese Ordnung einfügen. Der Phosphatasen-Nummer folgt zur Kennzeichnung der katalytischen Untereinheit ein „C“, zur Kennzeichnung einer regulatorischen Untereinheit ein „R“ (Cohen, 1994 und 1997).

Im folgenden wird von „PP1“ die Rede sein. Die Bezeichnungen ihrer regulatorischen Untereinheiten nach biochemischer und struktureller Nomenklatur werden der Vollständigkeit

halber an entsprechender Stelle gegenübergestellt, ansonsten wird jedoch ihr ursprünglicher Name verwendet.

## 2.2 Die Protein-Phosphatase Typ 1

In Säugetieren wurden mit  $\alpha$ ,  $\beta$  (=  $\delta$ ),  $\gamma_1$  und  $\gamma_2$  bisher vier Isoformen der PP1 beschrieben, wobei die  $\gamma$ -Isoformen durch alternatives Spleißen entstehen (Wera und Hemmings, 1995).

Die PP1 ist an der Regulation zahlreicher Prozesse wie Translation, Transkription, Glykogenstoffwechsel, Muskelkontraktion und neuronaler Signaltransduktion beteiligt. Diese Vielfalt wird vor allem durch Komplexe ermöglicht, in denen die katalytische Untereinheit der PP1 an jeweils unterschiedliche Lokalisationsuntereinheiten gebunden ist. Desweiteren wird die Aktivität der PP1 durch Phosphorylierung und Bindung an Inhibitoren reguliert. Aussagen über Aktivierung/Inaktivierung beziehen sich hierbei meist auf die Umsetzung von phosphorylierter Glykogen-Phosphorylase.

Die PP1 wird *in vitro* sowohl an Threonin- als auch an Tyrosinresten phosphoryliert. In beiden Fällen hat die Phosphorylierung eine Verringerung der PP1-Aktivität zur Folge (Dohadwala et al., 1994; Johansen und Ingebritsen, 1986). Als cytosolische Inhibitoren wurden Inhibitor-1 (PPP1R1A), sein neuronales Homolog DARPP-32 (dopamine- and cAMP-regulated phosphoprotein, 32 kDa; PPP1R1B), Inhibitor-2 (PPP1R2) (Aggen et al., 2000), Inhibitor-3 (Zhang et al., 1998), RIPP-1 (ribosomal inhibitor of PP1; Beullens et al., 1996) und CPI17 (PKC-potentiated PP1 inhibitory protein of 17 kDa; Eto et al., 1997) beschrieben. p53BP2 (p53 binding protein; Helps et al., 1995) und sds22 (suppressor of dis 2; Dinischiotu et al., 1997) zählen zu den nukleären Inhibitoren der PP1.

Das Prinzip der Regulation von Enzymen über Lokalisationsuntereinheiten – heute für viele Protein-Kinasen und Protein-Phosphatasen beschrieben – wurde an der PP1 entdeckt und soll im folgenden näher erläutert werden (Hubbard und Cohen, 1993).

Bisher sind rund 30 Lokalisationsuntereinheiten der PP1 in Säugetieren charakterisiert worden (Aggen et al., 2000). Sie verändern die Substratspezifität der PP1, lokalisieren sie in bestimmten subzellulären Kompartimenten und ermöglichen eine Einflußnahme intra- und

extrazellulärer Signale auf die Aktivität der PP1. In den meisten Fällen ist die PP1 über ihren C-terminalen hydrophoben Bereich an ein R/K-V/I-x-F-Motiv der Lokalisationsuntereinheit gebunden. Dadurch wird ein gleichzeitiges Binden mehrerer Lokalisationsuntereinheiten ausgeschlossen (Egloff et al., 1997). Ihre Interaktion mit der PP1 beruht oft nicht alleine auf diesem Motiv. Für die Bindung der PP1 an Yotiao beispielsweise ist es nicht essentiell (Westphal et al., 1999).

Die Komplexität, mit der zentrale Vorgänge in der Zelle über die Bindung der PP1 an Lokalisationsuntereinheiten und Inhibitoren reguliert werden, soll an 4 Beispielen näher beschrieben werden.

### **Glykogen-bindende Holoenzyme der PP1**

Bisher wurden vier Proteine identifiziert, die die PP1 am Glykogen lokalisieren –  $G_M$  (PPP1R3),  $G_L$  (PPP1R4), PTG (protein targeting to glycogen; PPP1R5) und PPP1R6.

Im Skelettmuskel ist die PP1 an das N-terminale Ende der  $G_M$ -Untereinheit (124 kDa) gebunden, die wiederum über eine zentrale Domäne am Glykogen verankert ist (Strålfors et al., 1985; Walker et al., 2000). Dadurch wird die PP1 in der Nähe ihrer Substrate Glykogen-Synthase und Glykogen-Phosphorylase verankert und ihre Aktivität gegenüber diesen Substraten erhöht. Die Dephosphorylierung führt zu einer Aktivierung der Glykogen-Synthase, Hemmung der Glykogen-Phosphorylase und somit zur Glykogensynthese (Hubbard und Cohen, 1989b). Adrenalin aktiviert durch Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration die cAMP-abhängige Protein-Kinase (PKA). Diese phosphoryliert die  $G_M$ -Untereinheit in der PP1-Bindungsdomäne und den Inhibitor-1, wodurch die Affinität der PP1 zur  $G_M$ -Untereinheit verringert und die Affinität zum Inhibitor-1 erhöht wird. Die PP2B ist ein möglicher Gegenspieler der PKA und dephosphoryliert die  $G_M$ -Untereinheit und den Inhibitor-1 (Hiraga und Cohen, 1986; Hubbard und Cohen, 1989a).

Die  $G_M$ -Untereinheit lokalisiert die PP1 im Skelettmuskel nicht nur am Glykogen, sondern über ihren hydrophoben C-Terminus auch am sarkoplasmatischen Retikulum (Hubbard et al., 1990; Tang et al., 1991). Auch hier führt die Phosphorylierung der  $G_M$ -Untereinheit durch die PKA zur Freisetzung der PP1 (Hubbard et al., 1990; Walker et al., 2000).

Die Leber-spezifische  $G_L$ -Untereinheit (33 kDa) bindet die PP1 an ihrem N-Terminus und ist über eine zentrale Domäne am Glykogen verankert. Glucagon führt über cAMP und die PKA zur Phosphorylierung/Aktivierung der Phosphorylase-Kinase, die wiederum die Glykogen-Phosphorylase phosphoryliert/aktiviert. Diese bindet in der phosphorylierten Form an das C-terminale Ende der  $G_L$ -Untereinheit und hemmt die Dephosphorylierung/Aktivierung der Glykogen-Synthase durch die PP1 (Doherty et al., 1995; Armstrong et al., 1998).

PTG kommt in Fettzellen, im Skelett- und im Herzmuskel sowie in der Leber vor. Im Gegensatz zur  $G_M$ - und  $G_L$ -Untereinheit verankert PTG nicht nur die PP1, sondern auch die Phosphorylase-Kinase, die Glykogen-Phosphorylase und die Glykogen-Synthase am Glykogen (Doherty et al., 1996; Printen et al., 1997).

Die PPP1R6 ist im Gegensatz zu den bisher erwähnten glykogenbindenden Untereinheiten, die vor allem in Geweben mit Beteiligung am Glykogen-Stoffwechsel vorkommen, auch in vielen anderen Geweben zu finden. Desweiteren unterliegt sie keinen kovalenten und allosterischen Modifikationen wie die  $G_M$ - und die  $G_L$ -Untereinheit (Armstrong et al., 1997).

### **Myosin-bindende Holoenzyme der PP1**

In der Skelettmuskulatur ist die PP1 nicht nur an die  $G_M$ -Untereinheit gebunden, sondern bildet auch einen Komplex mit dem Genprodukt von MYPT2 (myosin phosphatase targeting subunit 2, 110 kDa; Dent et al., 1992; Moorhead et al., 1998).

Der Komplex der PP1 in der glatten Muskulatur wurde in der Magenmuskulatur vom Huhn als Heterotrimer entdeckt, in dem die PP1 und eine  $M_{20}$ -Untereinheit (21 kDa) an eine  $M_{110}$ -Untereinheit (110-130 kDa) gebunden sind (Alessi et al., 1992). Von der  $M_{20}$ -Untereinheit ist bisher keine Funktion in diesem Komplex bekannt.

Die  $M_{110}$ -Untereinheit bindet an die leichte Kette des Myosins und beschleunigt deren Dephosphorylierung durch die PP1 (Alessi et al., 1992). Weiterhin nehmen verschiedene Faktoren über die  $M_{110}$ -Untereinheit Einfluß auf die Aktivität der PP1 und damit auf den Phosphorylierungszustand der leichten Kette des Myosins. Die Hemmung der PP1 führt hierbei über die Phosphorylierung der leichten Kette zur Aktivierung von Myosin II und damit zur Kontraktion und umgekehrt. Beispielsweise bindet die cGMP-abhängige Protein-Kinase  $I\alpha$  (cGKI $\alpha$ ) an die  $M_{110}$ -Untereinheit und aktiviert die PP1 (A.P. und A.V. Somlyo,

2000; Surks et al., 1999). Desweiteren ist die aktivierte, GTP-bindende Form von Rho an die M<sub>110</sub>-Untereinheit gebunden und aktiviert die Rho-Kinase, die wiederum über die Phosphorylierung der M<sub>110</sub>-Untereinheit die PP1 hemmt (Kimura et al., 1996). Die M<sub>110</sub>-Untereinheit bringt demnach die PP1 mit zwei Protein-Kinasen gegensätzlicher Wirkung auf die Aktivität der PP1 zusammen. In diesem Multienzymkomplex haben über NO/Guanylatzyklase/cGMP und GTP/Rho verschiedene Signalmoleküle Einfluß auf Kontraktion und Relaxation der glatten Muskulatur.

Phospholipide binden an die M<sub>20</sub>- und M<sub>110</sub>-Untereinheit, wodurch es zur Hemmung der PP1 kommt (Ito et al., 1997). CPI17 hat im unphosphorylierten Zustand eine geringe Affinität zur PP1. Die Protein-Kinase C phosphoryliert CPI17, so daß es die PP1 bindet und hemmt (Eto et al., 1997). Arachidonsäure hemmt *in vitro* die PP1 durch Spaltung des PP1-Komplexes (Gong et al., 1992).

### **Nukleäre Holoenzyme der PP1**

Mit NIPP-1 (nuclear inhibitor of PP1; 39 kDa) und PNUTS (phosphatase 1 nuclear targeting subunit; 93 kDa) wurden zwei Lokalisationsuntereinheiten der PP1 im Zellkern identifiziert. Beide hemmen die PP1 und weisen RNA-bindende Eigenschaften auf (Jagiello et al., 1997; Allen et al., 1998). Die Phosphorylierung von NIPP-1 durch die PKA und die Casein-Kinase II hebt die Hemmung wieder auf, ohne jedoch die PP1 freizusetzen (Vulsteke et al., 1997).

### **Holoenzyme der PP1 im Zentralnervensystem**

Im Gehirn ist die PP1 unter anderem an Neurofilament-L (Terry-Lorenzo et al., 2000), Neurabin, Yotiao und DARPP-32 (siehe unten) gebunden.

Neurabin (neural tissue-specific F-actin-binding protein) kommt in zwei Isoformen vor, Neurabin I (123 kDa) und Neurabin II (Spinophilin; 90 kDa). Sie binden die PP1 und lokalisieren sie aufgrund ihrer F-Actin-Bindungsdomäne wahrscheinlich an den sogenannten „postsynaptic densities“, einem Netzwerk von Proteinen an der Innenseite postsynaptischer Membranen (MacMillan et al., 1999; Allen et al., 1997). An Neurabin gebundene PP1 hat eine verringerte Aktivität gegenüber phosphorylierter Glykogen-Phosphorylase (McAvoy et

al., 1999; Hsieh-Wilson et al., 1999). Spinophilin bindet intrazellulär an den Dopamin-2-Rezeptor (Smith et al., 1999). Es wird daher vermutet, daß die PP1 über Spinophilin in der Nähe ihrer Substrate, wie zum Beispiel AMPA ( $\alpha$ -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionsäure)-Kanälen und Dopamin-Rezeptoren, lokalisiert wird (Yan et al., 1999; Smith et al., 1999).

Yotiao ist ein AKAP (A-kinase anchoring protein; Colledge und Scott, 1999), welches neben der PKA auch die PP1 bindet und am NMDA (N-methyl-D-aspartat)-Rezeptor verankert. Diese Enzyme steuern die Aktivität dieses Kanals über reversible Phosphorylierung (Westphal et al., 1999). Neben Yotiao gehören auch AKAP220 und CG-NAP (centrosome and Golgi localized PKN-associated protein) zu den PP1-bindenden Mitgliedern dieser Familie (Schillace und Scott, 1999; Takahashi et al., 1999).

Über die Phosphorylierung von DARPP-32 am Threonin-34 nehmen unter anderem die Neurotransmitter Dopamin und Glutamat Einfluß auf die Aktivität der PP1. Im phosphorylierten Zustand bindet und hemmt DARPP-32 die PP1 (Hemmings et al., 1984). Während Dopamin über Bindung an D1-Rezeptoren und Aktivierung der PKA die Phosphorylierung von DARPP-32 zur Folge hat, aktiviert Glutamat über Bindung an NMDA-Rezeptoren die PP2B, die DARPP-32 dephosphoryliert. Die reversible Phosphorylierung von DARPP-32 durch die PKA und die PP2B und damit die Aktivität der PP1 wird von weiteren Protein-Kinasen und Protein-Phosphatasen beeinflusst: Während die Phosphorylierung von DARPP-32 durch die Casein-Kinase II (CK2) die Phosphorylierung durch die PKA verstärkt, verlangsamt die Phosphorylierung durch die Casein-Kinase I (CK1) die Dephosphorylierung durch die PP2B. Die Phosphorylierung durch die CK1 kann durch die PP2C rückgängig gemacht werden. Die Phosphorylierung durch CK2 und CK1 fördert somit die Hemmung der PP1 durch Dopamin und hemmt die Aktivierung der PP1 durch Glutamat. Als Substrate der PP1 werden in diesem Zusammenhang  $\text{Ca}^{2+}$ - und  $\text{Na}^{+}$ -Kanäle,  $\text{Na}^{+}/\text{K}^{+}$ -ATPase und NMDA-Rezeptoren beschrieben (zusammengefaßt in Greengard et al., 1998).

## 2.3 Die Protein-Phosphatase Typ 1 in der Retina der Säugetiere

Die Retina selbst ist Teil des Zentralnervensystems. Sie entwickelt sich während der Embryogenese – wie auch das Pigmentepithel – aus einer Ausstülpung des Neuralrohres, während die Augenlinse vom darüberliegenden Ektoderm stammt. Diese Entwicklung hat ein „inverses Auge“ zur Folge, die Photorezeptorzellen (Stäbchen und Zapfen) liegen auf der lichtabgewandten Seite der Retina (Zigmond et al., 1999).

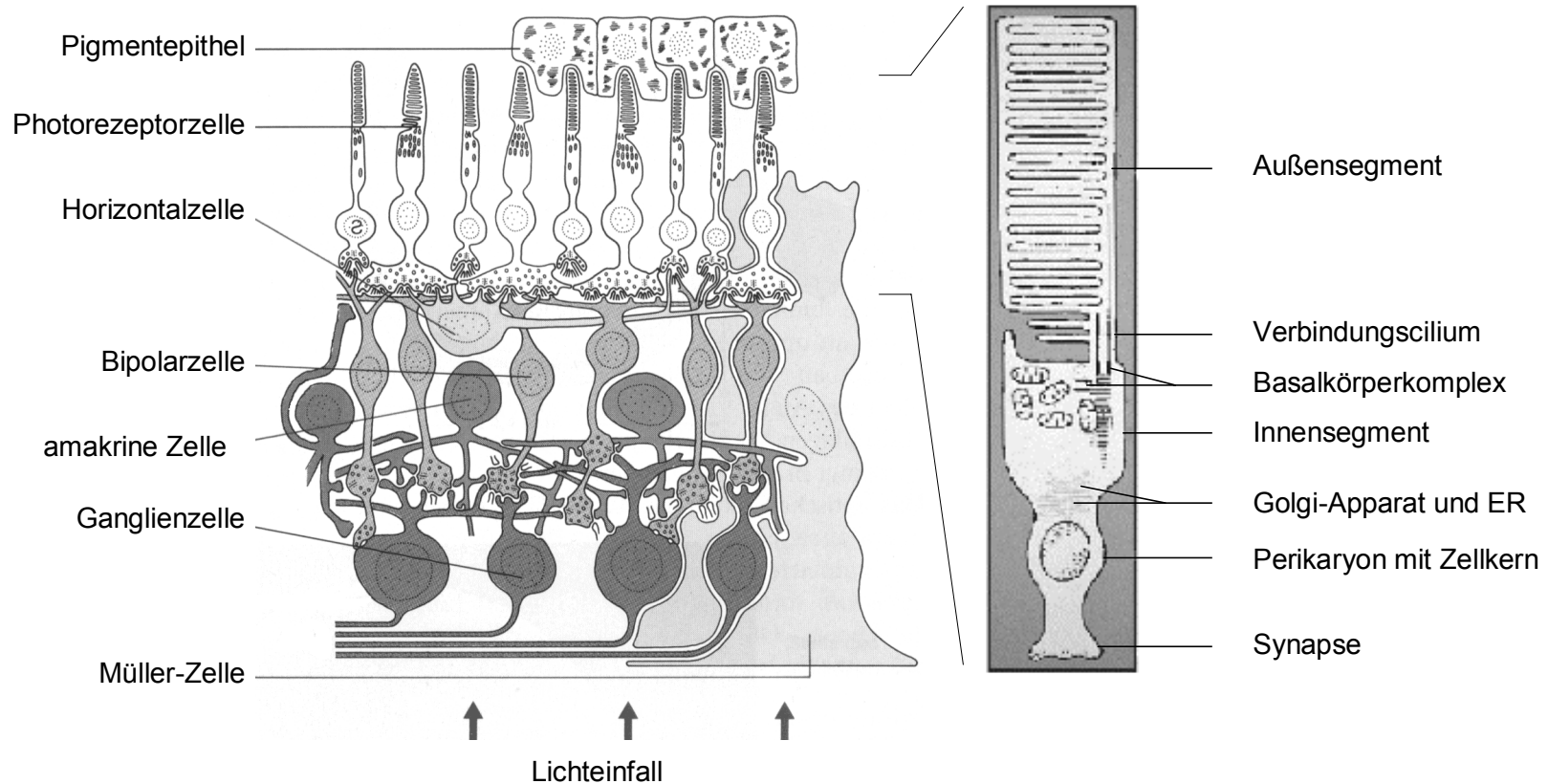
Die Retina ist aus folgenden Schichten aufgebaut:

1. äußere Körnerschicht (Perikaryen der Photorezeptorzellen)
2. äußere plexiforme Schicht (Bereich der Synapsen der Photorezeptorzellen und der Interneurone: Bipolarzellen, Horizontalzellen und amakrine Zellen)
3. innere Körnerschicht (Perikaryen der Interneurone)
4. innere plexiforme Schicht (Bereich der Synapsen der Interneurone und der Ganglienzellen)
5. Ganglienzellschicht
6. Nervenfaserschicht (Axone der Ganglienzellen)

Während die Bipolarzellen Photorezeptorzellen und Ganglienzellen verbinden, stellen die übrigen Interneurone Querverbindungen zwischen den neuronalen Zellen der Retina her (Zigmond et al., 1999). Desweiteren wird die Retina von Müller-Zellen durchzogen (Abb. 1).

Die Photorezeptorzellen sind auf die Absorption von Licht hochspezialisierte Zellen polaren Aufbaus mit morphologisch und funktionell differenzierbaren Bereichen. Während das Innensegment als Ort der Proteinsynthese Mitochondrien, Endoplasmatisches Retikulum und den Golgi-Apparat enthält, sind im Außensegment flache, dichtgepackte Membransäckchen (Disks) zu finden. Hier wird Licht in ein elektrisches Signal umgewandelt (photo-elektrische Transduktion). Die Disks werden lebenslang und kontinuierlich an der Basis der Außensegmente gebildet und an der Spitze der Außensegmente von den Zellen des Pigmentepithels phagozytiert. Außen- und Innensegment sind über das Verbindungscilium miteinander verbunden. Das Innensegment geht in das Perikaryon mit dem Zellkern und die Synapse über, die das im Außensegment erzeugte Signal an die anderen Zellen weiterleitet (Molday, 1998).





**Abb. 1: Die Retina der Säugetiere.**

In der Retina (links) liegen die Photorezeptorzellen (rechts ein Stäbchen als vergrößerter Ausschnitt) auf der dem Licht abgewandten Seite. ER = Endoplasmatisches Retikulum. Die Abbildungen sind aus Dowling und Boycott (1966) und Wolfrum (1995) entnommen.

Reversible Phosphorylierung ist von vielen an der photo-elektrischen Transduktion beteiligten Proteinen beschrieben. In den meisten Fällen sind die Protein-Kinasen bekannt, die entsprechenden Protein-Phosphatasen wurden bisher wenig untersucht. Die PP1 und die PP2A wurden im Außensegment nachgewiesen (Fowles und Akhtar, 1989). Es wird vermutet (Beweise fehlen bis heute), daß sie an der Modulation der Sensitivität der cGMP-abhängigen Ionenkanäle beteiligt sind (Gordon et al., 1992). Die PP2A ist für die Dephosphorylierung von Rhodopsin verantwortlich (Fowles und Akhtar, 1989). Die Funktion der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Isoform der PP2C (Klumpp et al., 1998a) und der PP7 (Huang und Honkanen, 1998) in der Retina der Säugetiere ist unbekannt.

Die oben erwähnte Lokalisierung der PP1 in der Photorezeptorzelle beruht auf Aktivitätsmessungen an Präparationen des Außensegments. Dabei wurde nicht untersucht, ob die PP1 auch in der Retina als Komplex vorliegt (Fowles und Akhtar, 1989). In einer anderen Präparation der Retina wurde nach Aufreinigung der PP1 ihre Aktivität in den Fraktionen einer Gelfiltrationssäule gemessen. Danach kommt die PP1 monomer und als hochmolekularer Komplex mit einer Größe von etwa 300 - 350 kDa vor. Säulenchromatographisch war eine weitere Aufreinigung und Identifizierung des Komplexes aufgrund seiner Instabilität nicht möglich. Weiterhin war auffallend, daß in einigen Fällen ein erheblicher Teil der PP1-Aktivität im Ausschlußvolumen der Superdex 200 gemessen wurde. Welche Isoform der PP1 in diesen Komplexen vorkommt, konnte nicht ermittelt werden (Anton, 1996).

Aufgrund der geschilderten Daten über die PP1 in der Retina und der bisher bekannten Regulationsmechanismen der PP1 in anderen Geweben war es wahrscheinlich, daß die Spezifität der PP1 auch in der Retina über Lokalisationsuntereinheiten erreicht wird. Ziel dieser Arbeit war die Identifizierung einer in der Retina exprimierten Isoform der PP1. Subzelluläre Lokalisierung der katalytischen Untereinheit der PP1 und Identifizierung ihrer Bindeproteine sollten Rückschlüsse auf die physiologische Funktion der PP1 in der Retina der Säugetiere ermöglichen.

## 3 Materialien

### 3.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

**Amersham Pharmacia Biotech**/Freiburg: Nitrocellulose-Membran Hybond ECL; Photometer Ultrospec 1000; Spannungsquelle 2297 Macrodrive 5; FPLC-Pumpen P-500; FPLC-Controller LCC-500; FPLC-Fraktionssammler FRAC-100; FPLC-UV-Detektor 2151 CKB; Superdex 200 HR 10/30; Heparin Sepharose CL-6B; Protein A-Sepharose CL-4B; Q-Sepharose Fast Flow

**Amicon**/Witten: Centricon und Centriplus concentrators; Immobilon PVDF

**Beckman Coulter**/Unterschleißheim: Kühlzentrifuge J-21B; Rotor JA-20

**Biometra**/Göttingen: Blotter Fastblot B44 (ohne Kühlung)

**Bio-Rad Laboratories**/München: Glasröhrchen (2,4 mm Innendurchmesser, 18 cm Länge) und PROTEAN II xi 2-D-Zelle für die zweidimensionale Gelelektrophorese; Spannungsquelle 200/2.0; Blotter Trans-Blot SD

**Eastman Kodak**/USA: Röntgenfilme X-OMAT XAR-5

**Eppendorf**/Hamburg: Thermomixer 5436; Tischzentrifuge 5410

**Fröbel Labortechnik**/Lindau: Rotator CMV-Jun

**Greiner Labortechnik**/Frickenhausen: Falcon-Röhrchen (15 ml, 50 ml); Mini-Reaktionsgefäße (1,5 ml); Szintillationsgefäße (20 ml)

**Hamilton Bonaduz**/Schweiz: Probenaufgabespritze

**Heidolph**/Kelheim: Wipp-Schüttelmaschine Duomax 1030

**Hermle Labortechnik**/Wehingen: Kühlzentrifuge Z 323 K; Ausschwingrotor 220.72 V04; Festwinkelrotor 220.59 VO6

**Johanna Otto**/Bodelshausen: Horizontal-Schüttelmaschine KL2

**Millipore**/USA: Immobilon PVDF-Transfermembran

**Nalge Company**/USA: Nalgene Sterilfilter (0,2 µm)

**Pharmazeutisches Institut**/Tübingen: Gel-Gießapparaturen und -elektrophoresekammern

**Protec Gerätebau**/Oberstenfeld: Röntgenfilm-Entwicklungsmaschine Compact 35

**Ray Test**/Straubenhardt: Geldokumentationssystem: Cybertech CS 1, Cybertech ICC/4, Thermodrucker Mitsubishi P67E, Thermodrucker-Papier Mitsubishi K61B

**Sartorius**/Göttingen: Celluloseacetatfilter (0,2 µm Porengröße)

**Schleicher & Schuell**/Dassel: Nitrocellulose-Transfermembran Protran BA79; Gel-Blotting-Papier GB004

**Scientific Industries**/USA: Vortex-Genie 2-G560

**Serva**/Heidelberg: Dialyseschlauch Visking (21 mm Durchmesser)

**UniEquip**/Martinsried: Aspirator-Vakuum-pumpe UNIJET II

**WTW**/Weilheim i. OB: pH-Meter pH 525

## 3.2 Chemikalien

**AGS**/Heidelberg: Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung 30 % (37,5 : 1)

**Amersham Pharmacia Biotech**/Freiburg: ECL-Detektionsreagenz für Western-Blot

**Bio-Rad Laboratories**/München: Protein Assay-Reagenz; Coomassie Brilliant Blue R-250; vorgefärbte Markerproteine für SDS-PAGE (prestained Standards)

**Boehringer Mannheim**/Mannheim: Markerproteine für Gelfiltration und SDS-PAGE (Combithek)

**Merck**/Darmstadt: Magermilchpulver

**Riedel-de Haën**/Seelze: Salzsäure, Natronlauge; alle organischen Lösungsmittel

**Serva**/Heidelberg: BlueSlick (zur Beschichtung der Glasröhrchen für die zweidimensionale Gelelektrophorese; EDTA (Tetra-Natrium-Salz); HEPES (Natrium-Salz); Ponceau S; Saccharose; TRIS; Tween 20

**Sigma**/Deisenhofen: Coomassie Brilliant Blue G (kolloidales Konzentrat); BSA; CAPS; alle hier nicht aufgeführten Chemikalien

**Stearling Diagnostic Imaging**/Bad Homburg: Röntgenfilmentwickler Cronex MD; Röntgenfilmfixierer Cronex MF-E

### 3.3 Antikörper

**DIG Glycan Detection Kit** (Roche Diagnostics/Mannheim)

**Kontrollserum**, vom Kaninchen, freundlicherweise von der Firma Chiron Behring, Marburg zur Verfügung gestellt

#### **Primäre Antikörper:**

Die verdünnten Lösungen waren nach Zugabe von 0,02 %  $\text{NaN}_3$  bei 4 °C über Monate stabil und konnten mindestens fünfmal wiederverwendet werden.

Antikörper gegen *PP1 $\gamma$*  (am Caltech, Pasadena/USA hergestellt):

vom Kaninchen, polyklonal; Antikörper gegen das Peptid GMITKQAKK (C-Terminus der PP1 $\gamma$ ), verwendet wurde die fünfte Blutung

Antikörper gegen *PP1 $\gamma$*  (Santa Cruz Biotechnology/USA; Bestellnummer sc-6109):

von der Ziege, polyklonal; Antikörper gegen das Peptid ADLDKLNIDSIIQRLLEVRC (N-Terminus der PP1 $\gamma$ ), affinitätsgereinigt

Antikörper gegen *Myosin VIIa* (von U. Wolfrum, Universität Mainz freundlicherweise zur Verfügung gestellt):

vom Kaninchen, polyklonal; Peptid-Antikörper gegen eine 131 Aminosäuren umfassende Sequenz in der Schwanzdomäne von Myosin VIIa der Maus (Liu et al., 1997), affinitätsgereinigt

Antikörper gegen *Centrin* (von U. Wolfrum, Universität Mainz freundlicherweise zur Verfügung gestellt):

von der Maus, monoklonal (Klon 20H5); gegen Centrin von *Chlamydomonas* gerichtet (Wolfrum und Salisbury, 1998)

### **Sekundäre Antikörper:**

Lagerung der verdünnten Lösungen war nicht möglich, da Zugabe von 0,02 % NaN<sub>3</sub> das Detektionssystem schädigt.

anti-Kaninchen-Antikörper:

vom Esel, Peroxidase-gekoppelt (Amersham Pharmacia Biotech/Freiburg; Bestellnummer NA 934)

von der Ziege, Rhodamin-gekoppelt (Cappel/USA; Bestellnummer 55666)

anti-Ziegen-Antikörper:

vom Esel, Peroxidase-gekoppelt (Santa Cruz Biotechnology/USA; Bestellnummer sc-2020)

anti-Maus-Antikörper:

von der Ziege, FITC-gekoppelt (Cappel/USA; Bestellnummer 55493)

### 3.4 Puffer

Die Einstellung des pH-Wertes erfolgte bei Raumtemperatur.

#### 3.4.1 Gewinnung des Schüttelüberstandes der Retinae

Extraktionspuffer: 20 mM TRIS/HCl, pH 7,0  
600 mM Saccharose, 10 mM Glucose,  
0,2 mM EDTA, 0,1 % 2-ME,  
0,1 mM PMSF in DMSO, 1 mM Benzamidin

#### 3.4.2 Präparation der Außensegmente/des Cilienapparates

HERT-Puffer: 2,1 mM HEPES/NaOH pH 7,4, 4 mM NaHCO<sub>3</sub>, 0,1 mM Ascorbinsäure, 0,5 mM Taurin, Earle's balanced salt solution (1x)

HERT-Puffer (modifiziert): 100 mM HEPES/NaOH pH 7,4,  
10 mM MgSO<sub>4</sub>, 100 mM KCl

Cytoskelett-Extraktionspuffer: 100 mM HEPES/NaOH pH 7,4, 10 mM MgSO<sub>4</sub>, 100 mM KCl, 10 mM EGTA, 1 % DMSO, 20 mM DTT, 0,5 mM GTP, 2 % Triton X-100, 25 µg/ml Phalloidin, 0,04 mM Taxol, 0,1 mM PMSF in DMSO, 24 µM Leupeptin

PBS-Puffer: 8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 7,4;  
137 mM NaCl, 3 mM KCl

#### 3.4.3 Batch-Verfahren/Gelfiltration

Puffer A: 20 mM TRIS/HCl pH 7,0, 1 mM EDTA, 0,1 % 2-ME,  
5 % Glycerin, 0,02 % NaN<sub>3</sub>

Puffer B:	20 mM TRIS/HCl pH 7,0, 1 mM EDTA, 0,1 % 2-ME, 0,02 % $\text{NaN}_3$
Puffer C:	20 mM TRIS/HCl pH 7,0, 0,1 mM EDTA, 0,1 % 2-ME, 5 % Glycerin, 50 mM NaCl, 0,02 % $\text{NaN}_3$ , bidestilliertes Wasser, Sterilfiltration (0,22 $\mu\text{m}$ )

### 3.4.4 Elektrophorese

#### SDS-PAGE

Probenpuffer:	130 mM TRIS/HCl pH 6,8, 10 % SDS, 10 % 2-ME, 20 % Glycerol, 0,06 % Bromphenolblau
Sammelgelpuffer (4x):	0,5 M TRIS/HCl pH 6,8, 0,4 % SDS, 0,02 % $\text{NaN}_3$
Trenngelpuffer (4x):	1,5 M TRIS/HCl pH 8,8, 0,4 % SDS, 0,02 % $\text{NaN}_3$
Laufpuffer:	25 mM TRIS, 0,1 % SDS, 190 mM Glycin

#### Harnstoff/SDS-PAGE

Harnstoff wurde unter leichtem Erwärmen (Handwärme) gelöst.

Probenpuffer:	66 mM TRIS/HCl pH 6,8, 5 % SDS, 5 % 2-ME, 9 M Harnstoff, 0,03 % Bromphenolblau
Trenngelpuffer (1,7x):	625 mM TRIS/HCl pH 8,8, 0,17 % SDS, 10 M Harnstoff, 0,02 % $\text{NaN}_3$
Laufpuffer:	entspricht dem der denaturierenden Elektrophorese

#### Native PAGE

Die Puffer für die native eindimensionale Gelelektrophorese als auch für die native erste Dimension der zweidimensionalen Gelelektrophorese hatten dieselbe Zusammensetzung wie zuvor für die denaturierende Gelelektrophorese beschrieben, enthalten aber kein SDS und kein 2-ME.



### Semidry-Blotting

Transferpuffer 1:	25 mM TRIS, 190 mM Glycin, 10 % Methanol
Transferpuffer 2:	25 mM TRIS, 190 mM Glycin, 20 % Methanol, 0,1 % SDS
Transferpuffer 3:	10 mM CAPS/NaOH pH 10,0

### **3.4.5 Western-Blot**

TBST-Puffer:	10 mM TRIS/HCl pH 7,6, 150 mM NaCl, 0,1 % Tween 20
--------------	--

### **3.4.6 Detektion glykosylierter Proteine**

Puffer G1:	50 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4$ /KOH pH 6,5, 150 mM NaCl
Puffer G2:	100 mM Essigsäure/NaOH pH 5,5
Puffer G3:	50 mM TRIS/HCl pH 7,5, 150 mM NaCl
Puffer G4:	100 mM TRIS/HCl pH 9,5, 100 mM NaCl, 50 mM $\text{MgCl}_2$

### **3.4.7 Immunhistochemie**

PBS-Puffer:	entspricht dem PBS-Puffer unter 3.4.2
-------------	---------------------------------------

## **4 Methoden**

### **4.1 Gewinnung des Schüttelüberstandes der Retinae**

Die Rinderaugen wurden noch im Schlachthof auf Eis gelagert. Die Präparation der Retinae fand bei Tageslicht statt. Hierzu wurde der Augapfel entlang der Iris mit einem Skalpell aufgeschnitten und umgestülpt. Der Glaskörper war durch leichten Druck mit der Pinzette zu entfernen. Danach konnte die Retina ohne das darunterliegende Pigmentepithel mit einer Pinzette zusammengeschoben und vom Sehnerv abgeschnitten werden. Jede Retina wurde sofort in ein Szintillationsgefäß mit eiskaltem Extraktionspuffer gegeben. Insgesamt wurden je zehn Retinae in 10 ml Extraktionspuffer aufgenommen, von Hand geschüttelt (90 s, RT) und zentrifugiert (1 h, 48.000 g, 4 °C). Der Schüttelüberstand wurde dekantiert und bei –80 °C gelagert. Diese Aufarbeitung ist von einer Methode nach Schnetkamp und Daemen (1982) abgeleitet.

### **4.2 Präparation subzellulärer Bereiche der Photorezeptorzellen**

Diese nachfolgend beschriebenen Präparationen wurden von mir im Labor von Professor U. Wolfrum, Institut für Zoologie in Mainz durchgeführt.

Die Präparation der Retinae und die Aufreinigung über Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation erfolgte unter Rotlicht, so daß ein Ausbleichen des Rhodopsins vermieden wurde. Während der Aufreinigung konnten dadurch die Außensegmente an der roten Farbe des Rhodopsins von den übrigen Zellen der Retina unterschieden werden.

#### **4.2.1 Präparation der Retinae**

Die Rinderaugen wurden noch im Schlachthof mit Eis gekühlt und ein bis zwei Stunden im Dunkeln gelagert. Anschließend wurden die Retinae wie unter 4.1 beschrieben präpariert.

Dabei wurden je 10 Retinae in ein 50 ml-Falcon-Röhrchen mit 5 ml eiskaltem HERT-Puffer (+ 50 % Saccharose) gegeben und bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

#### **4.2.2 Präparation der Außensegmente**

Die Außensegmente der Rinderretinae wurden über eine Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation aufgereinigt (Fleischman et al., 1980). Alle Zentrifugationsschritte wurden mit einem Ausschwenkrotor durchgeführt.

Der Inhalt von 12 Falcon-Röhrchen entsprechend 120 Retinae wurde über Nacht auf Eis aufgetaut, 0,1 mM PMSF in DMSO hinzugegeben, von Hand geschüttelt, gevortex (60 s, RT) und gröbere Bestandteile durch ein Sieb (400 µm Maschenweite) abgetrennt. Der Siebrückstand wurde mit 2 ml HERT-Puffer (+ 50 % Saccharose, 0,1 mM PMSF in DMSO) versetzt und erneut durch das Sieb gegeben.

Das Homogenat wurde zu gleichen Teilen auf 5 ml HERT-Puffer (+ 50 % Saccharose) in 6 Zentrifugenröhrchen geschichtet und mit 1 ml HERT-Puffer bedeckt. Nach Zentrifugation (1 h, 31.000 g, 4 °C) wurde jeweils eine rote Bande an der Phasengrenze zum oberen HERT-Puffer abgenommen.

In 6 Zentrifugenröhrchen wurde ein kontinuierlicher Saccharosegradient (50 – 25 %) aufgebaut: In das vordere Röhrchen eines Gradientenmischers wurde HERT-Puffer (+ 50 % Saccharose), in das hintere Röhrchen HERT-Puffer (+ 25 % Saccharose) gefüllt. Der HERT-Puffer (+ 50 % Saccharose) wurde ständig gerührt. Nach Vorlauf von 2 ml in das Zentrifugenröhrchen wurde die Verbindung zum Röhrchen mit dem HERT-Puffer (+ 25 % Saccharose) geöffnet. Das abgenommene Homogenat wurde zu gleichen Teilen auf diese Gradienten geschichtet, mit 1 ml HERT-Puffer bedeckt und zentrifugiert (2 h, 31.000 g, 4 °C).

Nach der Zentrifugation war eine dunkelrote und eine hellrote Bande in der Mitte des Gradienten zu erkennen. Es wurde jeweils nur die obere dunkelrote Bande abgenommen und erneut auf 5 ml HERT-Puffer (+ 50 % Saccharose) in 6 Zentrifugenröhrchen geschichtet und mit 1 ml HERT-Puffer bedeckt. Nach Zentrifugation (1 h, 31.000 g, 4 °C) war eine dunkelrote Bande an der Phasengrenze zum oberen HERT-Puffer zu erkennen. Diese Bande wurde

abgenommen, mit HERT-Puffer 1 : 10 verdünnt und zentrifugiert (20 min, 39.000 g, 4 °C). Der Niederschlag wurde bei –80 °C aufbewahrt.

### **4.2.3 Extraktion des Cilienapparates**

Die Aufreinigung erfolgte wie unter 4.2.2 beschrieben mit dem Unterschied, daß nach der Zentrifugation mit kontinuierlichem Saccharosegradienten die dunkelrote und die hellrote Bande abgenommen wurde. Die weitere Aufarbeitung erfolgte nach Pagh-Roehl und Burnside (1995).

Der Niederschlag von 20 Retinae wurde in 500 µl eiskaltem Cytoskelettextraktionspuffer suspendiert, mehrmals durchpipettiert und auf Eis stengelassen (90 min). In einem Zentrifugenröhrchen wurden Puffer abnehmender Saccharosekonzentration (je 5 ml modifizierter HERT-Puffer mit 60 %, 50 % und 40 % Saccharose) übereinandergeschichtet. Auf diesen diskontinuierlichen Saccharosegradienten wurde die Suspension aufgetragen und zentrifugiert (3 h, 31.000 g, 4 °C). Anschließend wurde der gesamte Gradient in 1 ml Fraktionen von oben nach unten abgenommen und die Fraktionen mit angereicherten Cilienapparaten identifiziert. Hierzu wurden von jeder der 20 Fraktionen jeweils 20 µl abgenommen, auf ein mit Poly-L-Lysin beschichtetes Deckgläschen gegeben, angetrocknet und mit Antikörpern gegen Centrin detektiert (4.11).

Die mit Cilienapparaten angereicherten Fraktionen wurden vereinigt, mit PBS-Puffer 1 : 10 verdünnt und zentrifugiert (20 min, 100.000 g, 4 °C). Waschen des Niederschlags erfolgte durch fünfmaliges kurzes Suspendieren in 1 ml PBS-Puffer und Zentrifugation (20 s, 14.000 g, 4 °C). Der Niederschlag wurde bei –80 °C gelagert.

## **4.3 Aufreinigung im Batch-Verfahren**

Bei diesem Verfahren wird das Säulenmaterial im entsprechenden Puffer suspendiert (Klupp et al., 1998b). Das Suspendieren erfolgte im Falcon-Röhrchen (50 ml) durch „über-Kopf“-Bewegung (14 U/min, 6 °C) oder im Becherglas durch horizontale Kreisbewegungen

(160 U/min, auf Eis). Nach Ablauf der in Klammern genannten Inkubationszeit wurde zentrifugiert (50 ml Falcon-Röhrchen; 1 min, 617 g, 4 °C). Die regenerierten Materialien wurden in Ethanol (30 %) im Kühlschrank gelagert.

### **Q-Sepharose**

50 ml Q-Sepharose wurden auf 4 Falcon-Röhrchen (50 ml) aufgeteilt. Die angegebenen Volumina beziehen sich auf ein Falcon-Röhrchen.

Äquilibration:	10 ml Puffer A (3 x 10 min)
Inkubation:	20 ml Schüttelüberstand (4.1) (60 min)
Waschen:	10 ml Puffer A + 100 mM NaCl (5 min)
Elution:	10 ml Puffer A + 500 mM NaCl (60 min) 5 ml Puffer A + 500 mM NaCl (5 min)
Regeneration:	50 ml 2 M NaCl (10 min); 50 ml Puffer A (10 min)

### **Heparin Sepharose**

10 ml Heparin Sepharose wurden in einem Falcon-Röhrchen (50 ml) äquilibriert. Waschen, Elution und Regeneration fand in zwei Falcon-Röhrchen (50 ml) statt. Die angegebenen Volumina beziehen sich auf ein Falcon-Röhrchen.

Die Inkubation mit dem verdünnten Q-Sepharose-Eluat wurde aufgrund des großen Probevolumens in einem Becherglas (1 l) durchgeführt.

Äquilibration:	10 ml Puffer A (3 x 10 min)
Inkubation:	1 : 5 Verdünnung des Q-Sepharose-Eluats mit Puffer B (etwa 300 ml) (90 min)
Waschen:	10 ml Puffer B + 100 mM NaCl (5 min)
Elution:	20 ml Puffer B + 500 mM NaCl (60 min) 5 ml Puffer B + 500 mM NaCl (2 x 5 min)

Regeneration:            50 ml 5 M Harnstoff (10 min)  
                              50 ml 2 M NaCl (10 min)  
                              50 ml Puffer B (10 min)

### 4.4 Gelfiltration

Die Gelfiltration mittels FPLC wurde bei 4 °C durchgeführt und das Proteinprofil mit Hilfe eines UV-Detektors (280 nm) und eines Schreibers festgehalten.

Säulenmaterial:        Superdex 200 HR 10/30, Trennbereich 10 - 600 kDa  
Säulendimensionen:   24 ml (30 cm Länge, 10 mm Durchmesser)  
Flußrate:                0,5 ml/min  
Äquilibration:         3 Säulenvolumen Puffer C  
Auftrag:                 0,2 ml dialysierter Schüttelüberstand bzw.  
                              0,2 ml konzentriertes Heparin Sepharose-Eluat  
Fraktionsgröße:        0,2 ml  
Regeneration:         3 Säulenvolumen Puffer C

### 4.5 Proteinbestimmung

Proteinbestimmung erfolgte nach der Bio-Rad-Mikromethode (Bradford, 1976). Maximal 200 µl Probe wurden mit Wasser auf 800 µl aufgefüllt, mit 200 µl Bio-Rad-Reagenz versetzt und gemischt. Nach Inkubation (5 min, RT) wurde die Absorption bei 595 nm gemessen. BSA diente zur Erstellung der Eichgeraden (2 – 15 µg).

## **4.6 Proteinkonzentrierung**

### **4.6.1 Methanol-Aceton Fällung**

Die Probe wurde in einem Mini-Reaktionsgefäß mit dem vierfachen Volumen einer Methanol-Aceton-Mischung (1 + 1) versetzt, homogenisiert und erwärmt (5 min, 37 °C). Nach Zentrifugation (15 min, 12.800 g, RT) wurde der Überstand vorsichtig dekantiert und verworfen. Der Niederschlag wurde getrocknet (15 min, 56 °C) und mit 10 µl Wasser und 5 µl Probenpuffer (- Harnstoff) aufgenommen.

### **4.6.2 Ultrafiltration**

Die Konzentrierung mittels Ultrafiltration erfolgte durch Zentrifugation in Centricon- oder Centriplus-Röhrchen (10 kDa-Membran). Hierbei wurden bei einem Ausgangsvolumen von bis zu 2,5 ml die Centricon-Röhrchen (5.000 g, 4 °C), ansonsten die Centriplus-Röhrchen (3.000 g, 4 °C) verwendet. Nach Erreichen der gewünschten Konzentrierung wurde rezentrifugiert (2 min, 1.000 g, 4 °C). Zur Regeneration wurden die Röhrchen mit Wasser gefüllt, zentrifugiert (10 min, 3.000 g, 4 °C) und rezentrifugiert (2 min, 1.000 g, 4 °C). Die Röhrchen wurden anschließend in 20 %igem Ethanol gelagert.

## **4.7 Dialyse**

Die Dialyse diente zur Entfernung der Saccharose und der Glucose aus dem Schüttelüberstand (4.1). Hierzu wurde der Dialyseschlauch kurz in Dialysepuffer (20 mM HEPES/NaOH, pH 7,0; 0,2 mM EDTA; 0,1 mM PMSF; 1 mM Benzamidin; 0,1 % 2-ME) eingeweicht. Ein Ende des Dialyseschlauches wurde mit einer Klammer abgedichtet, der Schlauch mit 10 ml des Schüttelüberstandes luftblasenfrei gefüllt, mit einer zweiten Klammer verschlossen und an einem kleinen Schaumstoffblock befestigt. Dadurch konnte vermieden werden, daß der Schlauch im Dialysepuffer absinkt und durch den Rührfisch beschädigt wird. Der gefüllte Dialyseschlauch wurde in ein Becherglas mit 5 l vorgekühltem Dialysepuffer gegeben und

gerührt (20 h, 6 °C). Nach 10 h wurde der Dialysepuffer gewechselt. Anschließend wurde der dialysierte Schüttelüberstand aliquotiert und bis zur weiteren Verwendung bei –80 °C gelagert.

## 4.8 Elektrophoretische Methoden

Die Gele waren selbstgegossen und wurden maximal zwei Wochen bei 4 °C gelagert. Das Gel für die zweite Dimension der zweidimensionalen Gelelektrophorese wurde direkt nach der Herstellung verwendet, da eine Lagerung bei 4 °C aufgrund des hohen Harnstoffgehaltes nicht in Frage kam.

### 4.8.1 Denaturierende Gelelektrophorese

Die denaturierende Gelelektrophorese wurde im wesentlichen nach Laemmli (1970) durchgeführt. Die 0,5 mm dicken Minigele bestanden aus Sammelgel (etwa 25 mm lang, 95 mm breit) mit 12 Probetaschen (14 mm lang, 5 mm breit) und Trenngel (etwa 65 mm lang, 95 mm breit). Die Probe wurde somit über rund 10 mm gesammelt und über rund 65 mm aufgetrennt.

Für die Herstellung von 10 Minigelen wurden folgende Mengen verwendet. Der Anteil Acrylamid/Bisacrylamid ist bei niedrigerprozentigen Trenngelen zugunsten der Wassermenge entsprechend zu reduzieren.

Sammelgel	4,5 %	Trenngel	12,5 %
Acrylamid/Bisacrylamid	6 ml	Acrylamid/Bisacrylamid	25 ml
Sammelgelpuffer (4 x)	10 ml	Trenngelpuffer (4 x)	15 ml
Wasser	24 ml	Wasser	20 ml
TEMED	60 µl	TEMED	50 µl
APS (20 %)	120 µl	APS (20 %)	100 µl



Nach Mischen von Acrylamid/Bisacrylamid, Sammelgel- oder Trenngelpuffer und Wasser wurde die Polymerisation durch Zugabe von TEMED und APS gestartet. Als erstes wurde das Trenngel gegossen. Überschichtung mit Isopropanol während der Polymerisation (40 min) führte zum Ausschluß von Luftsauerstoff und zu einer ebenen Oberfläche. Anschließend wurden nach Entfernung des Isopropanols die Kämme angebracht und das Sammelgel gegossen (mindestens 20 min Polymerisationszeit). Entsprechend wurde zur Herstellung von Gelen mit diskontinuierlichem Trenngel vorgegangen. Das Trenngel war in diesem Fall in der unteren Hälfte 12,5 %ig und in der oberen Hälfte 6 %ig. Jeder Trenngelbereich wurde separat gegossen.

Maximal 15 µl Probe wurden mit 5 µl denaturierendem Probenpuffer (- Harnstoff) versetzt, nach Anstechen des Deckels erhitzt (5 min, 95 °C) und kurz zentrifugiert. Nach Auffüllen des Anoden- und Kathodenraums mit je 250 ml denaturierendem Laufpuffer wurde die vorbereitete Probe in die Tasche gefüllt und eine Spannung von 120 V angelegt, die nach Übergang der Bromphenolblaufront in das Trenngel auf 250 V erhöht wurde. Mit dem Austritt der Bromphenolblaufront aus dem Trenngel in den Laufpuffer war die Elektrophorese beendet.

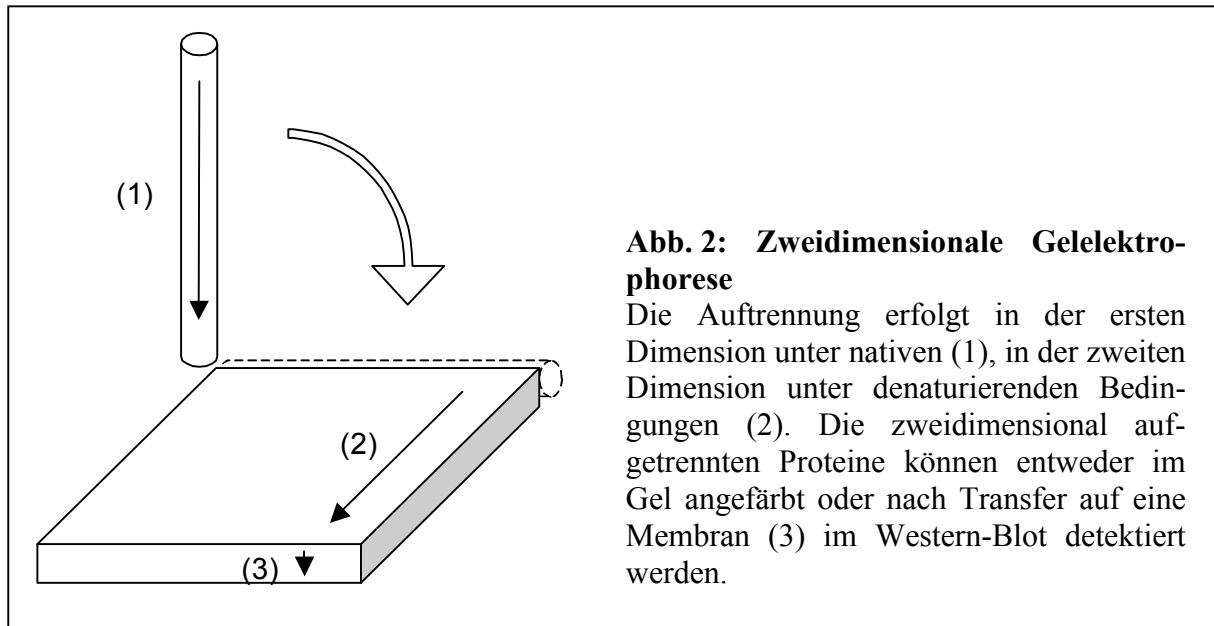
#### **4.8.2 Native Gelelektrophorese**

Aufbau und Herstellung der nativen Gele entsprach der Beschreibung für denaturierende Gele (4.8.1) unter Verwendung nativen Sammel- und Trenngelpuffers.

Maximal 10 µl Probe wurden mit 5 µl nativen Probenpuffer versetzt und durch mehrmaliges Aufziehen und Ausstoßen gemischt. Die Probe wurde nicht erhitzt und bis zum Auftrag auf Eis gelagert. Nach Auffüllen des Anoden- und Kathodenraums mit je 250 ml vorgekühltem, nativem Laufpuffer wurde die vorbereitete Probe in die Tasche des Gels gefüllt. Die Elektrophorese fand im Kühlschrank statt. Beim Übergang der Bromphenolblaufront vom Sammelgel in das Trenngel wurde die Spannung von 100 V auf 150 V erhöht.

### 4.8.3 Zweidimensionale Gelelektrophorese

Die zweidimensionale Gelelektrophorese bestand aus einer nativen Elektrophorese in der ersten Dimension und einer denaturierenden Elektrophorese in der zweiten Dimension (Schägger et al., 1994).



Das Gel der ersten Dimension wurde in einem Glasröhrchen (2,4 mm Innendurchmesser, 18 cm Länge) gegossen. Um das Gel nach der Elektrophorese leicht aus dem Glasröhrchen drücken zu können, wurde die Innenseite des Röhrchens beschichtet. Dazu wurde es auf einer Seite mit Parafilm abgedichtet, für 10 Minuten mit BlueSlick gefüllt und danach bei Raumtemperatur getrocknet. Anschließend wurde das Gel gegossen. Das Trenngel war 13 cm, das Sammelgel 1 cm und der Probenraum 4 cm lang. Eine Lösung aus nativem Trenngelpuffer, Wasser und Acrylamid/Bisacrylamid (Endkonzentration 8 %) wurde durch Anlegen eines Vakuums entgast (30 min) und anschließend mit TEMED und APS versetzt. Die rasch polymerisierende Lösung wurde mit einer Pasteurpipette in das mit Parafilm abgedichtete Glasröhrchen gefüllt und mit Isopropanol überschichtet. Entsprechend erfolgte das Gießen des 6 %igen Sammelgels, Entgasen war jedoch nicht nötig. Zur Lagerung wurde der Isopropanol mit Wasser herausgespült, der Probenraum mit Wasser aufgefüllt und mit

Parafilm verschlossen. Die Glasröhrchen konnten nach Reinigung mit Ethanol und Wasser wiederverwendet werden.

Das Gel der zweiten Dimension bestand nur aus einem harnstoffhaltigen Trenngel (85 mm hoch, 80 mm breit, 2,0 mm dick). Es hatte seitlich zwei kleine Probetaschen (5 mm hoch, 4 mm breit) für die Markerproteine und BSA und eine große Probetasche (5 mm hoch, 60 mm breit) zur Aufnahme des Gels der ersten Dimension. Für die Herstellung eines Gels wurden folgende Mengen verwendet:

Trenngel	8 %
Acrylamid/Bisacrylamid	8 ml
Trenngelpuffer (1,7 x)	18 ml
Wasser	4 ml
TEMED	25 µl
APS (20 %)	50 µl

Nach Mischen von Acrylamid/Bisacrylamid, Trenngelpuffer und Wasser wurde die Polymerisation durch Zugabe von TEMED und APS gestartet.

Die Probe wurde mit nativem Probenpuffer versetzt (2 Teile Probe + 1 Teil Probenpuffer), gemischt und auf Eis gelagert. Nach Einbau des Glasröhrchens in die Gelelektrophoresekammer PROTEAN II xi 2-D-Zelle wurde die Probe luftblasenfrei mit einer Hamiltonspritze aufgetragen und der verbleibende Probenraum sowie Kathoden- und Anodenraum mit gekühltem nativem Laufpuffer gefüllt. Die Zelle wurde in einen Kühlschrank gestellt und eine Spannung von 150 V so lange angelegt, bis die Bromphenolblau-Front im Trenngel eine Strecke von 6 cm zurückgelegt hatte (circa 4 h).

Um das Gel unbeschädigt aus dem Glasröhrchen zu drücken, wurde mit Hilfe einer Nadel (0,55 mm x 25 mm) so lange Wasser zwischen Glaswand und Trenngel gedrückt, bis es auf der Sammelgelseite wieder hervortrat. Dadurch konnte das Gel durch geringen hydrostatischen Druck auf Sammelgelseite aus dem Glasröhrchen auf eine mit Wasser benetzte Glasplatte gedrückt werden. Nach Abtrennen des Sammelgels und des Trenngels jenseits der Bromphenolblau-Front wurde das Gel für 10 min bei Raumtemperatur in denaturierendem Probenpuffer (+ Harnstoff) inkubiert.

Das Gel für die zweite Dimension wurde in die Elektrophoresekammer eingebaut und der Anoden- und Kathodenraum mit je 250 ml denaturierendem Laufpuffer gefüllt. Anschließend wurde das Gel der ersten Dimension in der großen Tasche so positioniert, daß sich sein oberer Trenngelbereich links befand (die Bromphenolblau-Front diente hier zur Orientierung) und ein guter Kontakt zum Gel der zweiten Dimension bestand. Desweiteren wurden 5 µl BSA (5 µg) bzw. 5 µl vorgefärbte Markerproteine mit 10 µl denaturierendem Probenpuffer (+ Harnstoff) gemischt und in die kleinen Taschen gegeben. Die anschließende Elektrophorese erfolgte bei 150 mA und war mit Austritt der Bromphenolblaufront aus dem Trenngel in den Laufpuffer beendet (circa 4 h).

### **4.8.4 Semidry-Blotting**

Die Proteine wurden elektrophoretisch im Semidry-Verfahren vom Trenngel auf eine Membran (Nitrocellulose oder PVDF) übertragen (Kyhse-Andersen, 1984).

Nach denaturierender Elektrophorese wurde der Transfer von Proteinen folgendermaßen durchgeführt: Membran und Blotting-Papiere wurden zurechtgeschnitten (9,0 cm x 7,5 cm) und wie das Polyacrylamidgel in Transferpuffer 1 (Transfer der PP1) oder in Transferpuffer 2 (Transfer von Myosin VIIa) äquilibriert (5 min). PVDF-Membranen mußten zusätzlich vorbehandelt werden (2 s in Methanol, 2 min in Wasser). Auf die Anode des Blotters wurden nacheinander Blotting-Papiere, die Membran, das Polyacrylamidgel und drei Blotting-Papiere gelegt. Nach Entfernen von Luftblasen mit Hilfe eines Glasstabes wurde die Kathode aufgesetzt. Der Transfer von Proteinen aus 0,5 mm dicken Gelen erfolgte mit dem Blotter der Firma Bio-Rad (PP1: 1 h, 10 V; Myosin VIIa: 2 h, 25 V), aus den 2 mm dicken Gelen der zweidimensionalen Gelelektrophorese mit dem Biometra-Blotter (1 h, 100 mA/Gel).

Der Transfer von Proteinen nach nativer Elektrophorese wurde entsprechend unter Verwendung des Transferpuffers 3 und des Biometra-Blotters (1 h, 170 mA/Gel) durchgeführt.

## 4.9 Proteindetektion

Nach Beendigung der Gelelektrophorese wurde das Sammelgel vom Trenngel mit einer Rasierklinge abgeschnitten und die Proteine nach den folgenden Verfahren detektiert. Wenn nicht anders erwähnt, erfolgten die Inkubationen bei Raumtemperatur unter leichten Schüttelbewegungen.

### 4.9.1 Coomassie-Färbung

Diese Methode verwendet Coomassie Brilliant Blue R-250 und diente der unspezifischen Detektion von Proteinen in 0,5 mm dicken Gelen (Nachweisgrenze: etwa 100 ng Protein/Bande). Das Polyacrylamidgel wurde zur Fixierung und Färbung in Färbelösung (0,2 % Coomassie Brilliant Blue R-250, 50 % Methanol, 10 % Essigsäure) inkubiert (mindestens 20 min) und anschließend so lange mit Entfärbelösung (30 % Ethanol, 7,5 % Essigsäure) behandelt, bis Proteinbanden deutlich sichtbar wurden. Lagerung des Gels in Wasser über Nacht bei 4 °C entfärbte den Hintergrund vollständig.

Die Färbung mit kolloidalem Coomassie Brilliant Blue G (Neuhoff et al., 1988) diente aufgrund der geringen Anfärbung des Hintergrundes der unspezifischen Detektion von Proteinen im 2 mm dicken Gel der zweidimensionalen Gelelektrophorese. Sie ist empfindlicher als die Färbung mit Coomassie Brilliant Blue R-250. Nach Inkubation des Polyacrylamidgels in Fixierlösung (30 min) erfolgte die Färbung (über Nacht). Das Konzentrat der Farbstoffsuspension wurde hierzu mit Methanol 1 : 5 verdünnt. Die Entfärbung wurde wie oben beschrieben durchgeführt.

Die gefärbten Gele wurden in Ethanol (10 %) bei 4 °C gelagert.

### 4.9.2 Silberfärbung

Die Silberfärbung (Blum et al., 1987) ist mit einer Nachweisgrenze von etwa 20 ng/Bande die empfindlichste unter den verwendeten unspezifischen Detektionsmethoden.

Das Polyacrylamidgel wurde in einem 1 l Becherglas nacheinander mit folgenden Lösungen inkubiert:

50 % Methanol, 12 % Essigsäure (3 x 15 min),

30 % Ethanol (3 x 5 min),

100 µl Formaldehyd 35 %, 75 µl Natriumthiosulfat 43 % in 150 ml Wasser (45 s),

Wasser (3 x 1 min),

100 µl Formaldehyd in 150 ml Silbernitratlösung 0,2 % (60 min),

Wasser (etwa 15 s).

Es folgte die Entwicklung der Banden (125 µl Formaldehyd 35 %, 2,5 µl Natriumthiosulfat 43 % in 250 ml Natriumcarbonat 6 %). Nach Erreichen der gewünschten Bandenintensität wurde kurz mit Wasser gewaschen und die Entwicklung durch Zugabe von Essigsäure (7 %) beendet. Abschließend wurde erneut mit Wasser gewaschen (2 x 5 min) und das Gel in Ethanol (30 %) bei 4 °C gelagert.

Nach der Entwicklung verwendete Lösungen waren vorgekühlt, um eine Gelbfärbung der Banden zu vermeiden. Formaldehyd (35 %) und Natriumthiosulfat (43 %) wurden erst kurz vor Gebrauch hinzugegeben.

### **4.9.3 Ponceau S-Färbung**

Die Ponceau S-Färbelösung (0,2 % Ponceau S in 3,0 % Trichloressigsäure) diente zur unspezifischen Detektion und Fixierung von Proteinen auf einer Nitrocellulose- und PVDF-Membran. Hierzu wurde die Membran nach dem Semidry-Blotting mit der Färbelösung behandelt (10 min). Zur Entwicklung der Banden wurde mit Wasser entfärbt, vollständige Entfärbung erfolgte mit TBST-Puffer.

### **4.9.4 Western-Blot**

Nach elektrophoretischer Auftrennung und Transfer der Proteine auf eine Membran (4.8) folgte die Behandlung mit Ponceau S-Lösung (4.9.3) und die Blockierung mit einer

Milchpulversuspension (30 min, 5 % in TBST-Puffer). Anschließend wurde die Membran mit TBST-Puffer gewaschen (1 x 15 min, 2 x 5 min) und mit dem ersten Antikörper inkubiert (über Nacht, 6 °C). Nach erneutem Waschen mit TBST-Puffer (1 x 15 min, 2 x 5 min) folgte die Inkubation mit dem zweiten Antikörper (1 h), der durch Waschen mit TBST-Puffer (1 x 15 min, 2 x 5 min) entfernt wurde. Während der anschließenden Inkubation der Membran mit ECL-Lösung (1 min) wurde nicht geschüttelt. Es folgten Abtropfen der ECL-Lösung, Abdecken der Membran mit Haushaltsfolie auf einer Glasplatte, Belichtung eines Röntgenfilms (1 min) und die maschinelle Entwicklung. Antikörper-Verdünnungen:

1. Antikörper (anti-PP1 $\gamma$ 1, vom Kaninchen) – 1 : 20.000 in TBST-Puffer mit 1 % BSA

1. Antikörper (anti-PP1 $\gamma$ , von der Ziege) – 1 : 200 in TBST-Puffer mit 5 % Milchpulver

1. Antikörper (anti-Myosin VIIa, vom Kaninchen) – 1 : 5.000 in TBST-Puffer

2. Antikörper (anti-Kaninchen-Antikörper) – 1 : 2.500 in TBST-Puffer

2. Antikörper (anti-Ziegen-Antikörper) – 1 : 2.000 in TBST-Puffer mit 5 % Milchpulver

Der Waschschrift nach dem Blockieren konnte entfallen, wenn zur Detektion der PP1 $\gamma$ -Antikörper verwendet wurde. Desweiteren war es möglich, die Inkubation mit diesem Antikörper bei Raumtemperatur (1 h) durchzuführen.

#### **4.9.5 Detektion von Glykoproteinen**

Die Detektion von Glykoproteinen wurde mit dem DIG Glycan Detection Kit durchgeführt. Gewaschen wurde 3 x 10 min mit der entsprechenden Lösung.

Nach Transfer auf eine Nitrocellulose-Membran (4.8.4) und Behandlung mit Ponceau S-Färbelösung (4.9.3) wurde die Membran mit Puffer G1 gewaschen und anschließend in einer Natriummetaperiodat-Lösung (10 mM in Puffer G2) inkubiert (20 min). Es folgten Waschen mit Puffer G1 und Inkubation mit der Digoxigenin-3-O-succinyl- $\epsilon$ -aminocaprinsäure-Lösung (1 h, 1 : 5.000 in Puffer G2). Nach Waschen mit Puffer G3 wurde die Membran blockiert (1 h, Blockierlösung 1 : 10 in Puffer G3) und nach erneutem Waschen mit Puffer G3 in einer

Lösung mit anti-Digoxigenin-Antikörpern (konjugiert mit alkalischer Phosphatase) inkubiert (1 h, 1 : 1.000 in Puffer G3). Anschließend wurde wieder mit Puffer G3 gewaschen und die Membran in der NBT/X-Phosphat-Lösung (1 : 50 in Puffer G4) ohne zu schütteln unter Vermeidung direkter Sonneneinstrahlung entwickelt (etwa 20 min). Die Entwicklung konnte durch mehrmaliges Spülen mit Wasser gestoppt werden.

### 4.10 Immunpräzipitation

Für die Immunpräzipitation wurde das unter 4.3 gewonnene Heparin Sepharose-Eluat mittels Ultrafiltration achtfach konzentriert. Da der verwendete Antikörper gegen die PP1 $\gamma$ 1 aus dem Kaninchen stammt, wurde Protein A-Sepharose zur Fällung des Antigen-Antikörper-Komplexes eingesetzt.

80  $\mu$ l Heparin Sepharose-Eluat, 4  $\mu$ l Serum und 16  $\mu$ l eines Puffers bestehend aus 20 mM TRIS/HCl pH 7,0, 1 mM EDTA, 0,1 % 2-ME wurden gemischt und inkubiert (1 h, 4 °C). Anschließend wurden 30  $\mu$ l Protein A-Sepharose durch sanfte „über-Kopf“-Bewegung (20 U/min, 4 °C) in dieser Lösung suspendiert (1 h, 4 °C). Nach einer Zentrifugation (20 s, 12.500 g, 4 °C) wurde der Überstand unter Verwendung einer feinen Nadel vollständig abgenommen und der Niederschlag zweimal in 1 ml TRIS/HCl (10 mM, pH 8) suspendiert (je 10 min, 4 °C) und wieder abzentrifugiert (20 s, 12.500 g, 4 °C). Der Überstand wurde jeweils vollständig abgenommen und verworfen.

Anschließend erfolgte die Extraktion der Protein A-Sepharose. Sie wurde auf zwei unterschiedliche Methoden durchgeführt:

- Nach Zugabe von 15  $\mu$ l denaturierendem Probenpuffer (- Harnstoff) wurde erhitzt (5 min, 95 °C), kurz zentrifugiert (20 s, 12.800 g) und der Überstand weiterverwendet.
- Die Protein A-Sepharose wurde in 200  $\mu$ l TRIS/HCl (10 mM, pH 8) suspendiert (30 min, 1.400 U/min im Thermomixer, RT), anschließend abzentrifugiert und der Überstand einer Methanol-Aceton Fällung (4.6.1) unterzogen. Der erhaltene Niederschlag wurde mit 10  $\mu$ l Wasser und 5  $\mu$ l denaturierendem Probenpuffer (- Harnstoff) aufgenommen und erhitzt (5 min, 95 °C).



## 4.11 Immunhistochemie

Von den isolierten, unfixierten Rinderretinae wurden im Labor von Prof. Wolfrum Längsschnitte (10 µm dick) hergestellt. Die unfixierten Schnitte wurden auf ein mit Poly-L-Lysin (0,01 %) beschichtetes Deckgläschen transferiert und mit einem Fettstift umkreist. Die folgenden Inkubationen bis zum Eindeckeln fanden in einem mit feuchtem Filterpapier ausgelegten kleinen Petrischälchen statt. Die Antikörper wurden in PBS-Puffer (+ 0,1 % Ovalbumin, 0,5 % Fischgelatine) verdünnt. Die Inkubation mit dem zweiten Antikörper und alle nachfolgenden Schritte wurden unter Vermeidung direkter Beleuchtung im Halbdunkel durchgeführt. Pro Schnitt wurden jeweils 50 µl der im folgenden genannten Lösungen aufgetragen und nach Ablauf der Inkubationszeit abgesaugt.

Die Schnitte wurden in PBS-Puffer (+ 0,01 % Tween 20) vorinkubiert (20 min, RT) und nach Waschen mit PBS-Puffer (1 x 5 min, RT) mit PBS-Puffer (+ 0,1 % Ovalbumin, 0,5 % Fischgelatine) blockiert (30 min, RT). Anschließend wurden die Schnitte mit Centrin-Antikörpern (1 : 250) und gleichzeitig mit PP1 $\gamma$ 1-Antikörpern (1 : 2.000) inkubiert (über Nacht, 4 °C).

Am nächsten Tag wurden die Schnitte mit PBS-Puffer (3 x 10 min, RT) gewaschen und anschließend mit anti-Maus-Antikörpern (FITC-gekoppelt, 1 : 400) in Kombination mit anti-Kaninchen-Antikörpern (Rhodamin-gekoppelt, 1 : 400) inkubiert (90 min, RT).

Nach erneutem Waschen mit PBS-Puffer (3 x 10 min, RT) wurden die Schnitte viermal kurz in destilliertes Wasser getaucht, mit einem Filterpapier getrocknet und luftblasenfrei auf einem Objektträger in Mowiol (Hoechst 4.88) eingedeckelt und bis zur Verwendung bei 4 °C im Dunkeln gelagert.

Die Schnitte wurden mit dem Laser-Scanning-Mikroskop „LEICA TCSNT System“ unter Verwendung von zwei Lasern untersucht. Rhodamin/FITC wurde mit einer Wellenlänge von 550 nm (grün)/492 nm (blau) angeregt und emittierte bei 650 nm (rot)/520 nm (grün).

## 5 Ergebnisse

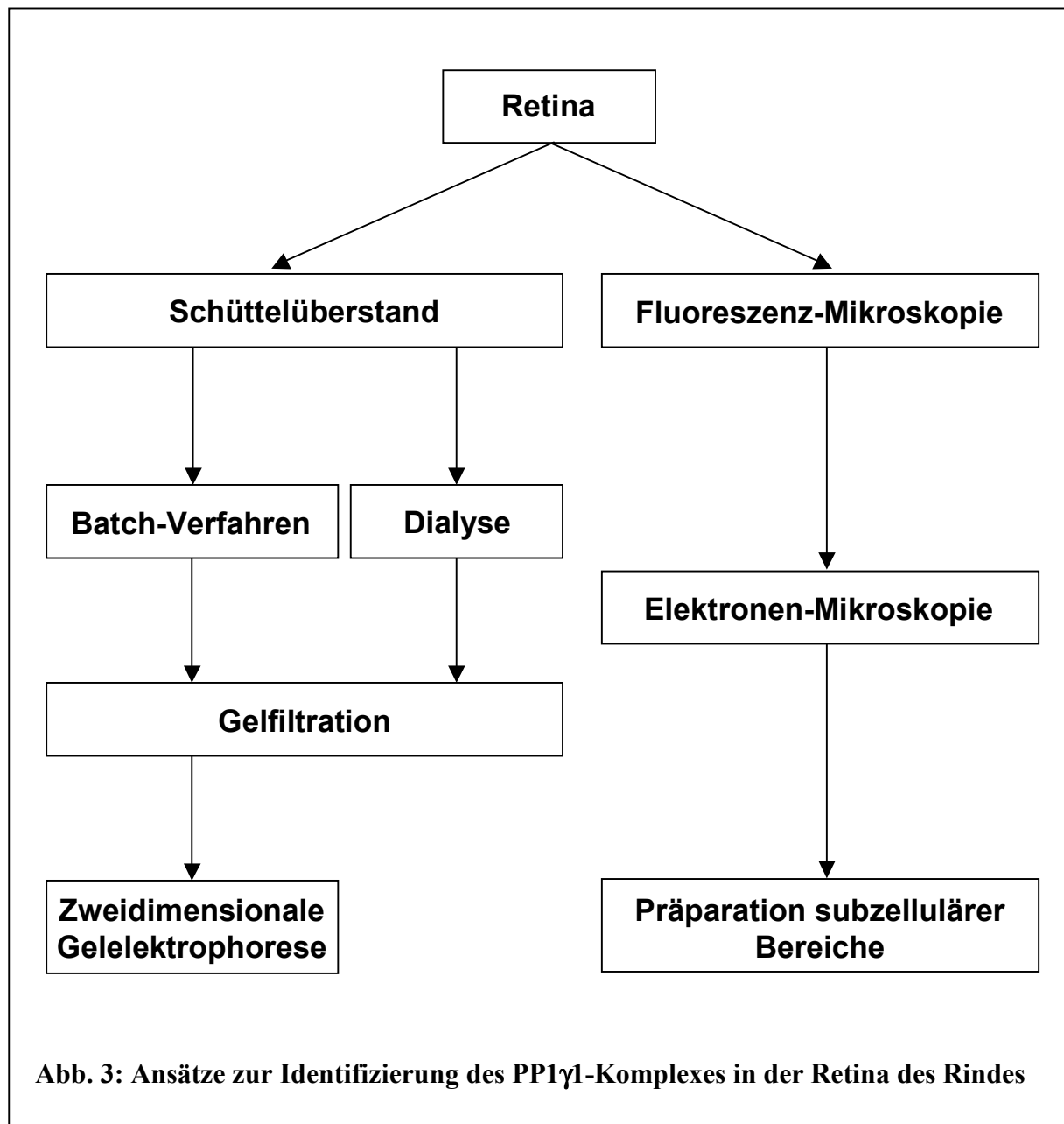
Grundlage zur Untersuchung der PP1 in der Retina des Rindes war die Detektion mit Isoform-spezifischen Antikörpern.

Im Schüttelüberstand der Retina-Präparation wurde die PP1 $\gamma$ 1 per Western-Blot nachgewiesen.

Nach der Dialyse dieses Schüttelüberstandes konnte die Existenz von Komplexen der PP1 $\gamma$ 1 gezeigt werden: Die PP1 $\gamma$ 1 eluierte von einer Gelfiltrationssäule unter nativen Bedingungen bei etwa 54 kDa und als hochmolekularer Komplex (> 600 kDa). Ein 49 kDa-Protein co-eluierte im hochmolekularen Bereich mit der PP1 $\gamma$ 1.

Da säulenchromatographische Ansätze zur Reinigung eines PP1-Komplexes aus dem Schüttelüberstand bereits in der Vergangenheit an seiner Instabilität scheiterten (Anton, 1996), wurde zur Identifizierung der PP1 $\gamma$ 1-Komplexe ein anderer Weg beschritten. Dieser bestand in der fluoreszenz- und elektronenmikroskopischen Lokalisierung der PP1 $\gamma$ 1 in der Retina, so daß die gezielte Isolierung eines Proteinkomplexes, an dem die PP1 $\gamma$ 1 gebunden ist, möglich wurde. Desweiteren konnte die PP1 $\gamma$ 1 immunpräzipitiert werden.

Mit dem Batch-Verfahren wurde aus dem Schüttelüberstand ein 68 kDa-Protein aufgereinigt, das im Western-Blot vom PP1 $\gamma$ -Antikörper detektiert wurde. In einer nativen Gelfiltration dieses aufgereinigten Schüttelüberstandes eluierte das 68 kDa-Protein bei 250 kDa. Im Anschluß an eine zweidimensionale Gelelektrophorese bestehend aus nativer (1. Dimension) und denaturierender (2. Dimension) Elektrophorese konnte das 68 kDa-Protein schließlich identifiziert werden. Weiterhin war es durch die zweidimensionale Gelelektrophorese möglich, ein 89 kDa-Protein als Bindungspartner dieses Proteins zu reinigen und zu identifizieren (Abb. 3).



## 5.1 Detektion retinaler PP1 $\gamma$ 1 im Western-Blot

Die PP1 $\gamma$ 1 ist mit 323 Aminosäuren und einem apparenten Molekulargewicht von 37,0 kDa 1,5 kDa kleiner als PP1 $\gamma$ 2 (338 Aminosäuren/38,5 kDa). Diese Isoformen entstehen durch alternatives Spleißen und unterscheiden sich in ihrer Aminosäuresequenz nur am C-Terminus. Zur spezifischen Detektion der PP1 $\gamma$ 1 im Western-Blot wurde daher ein Antikörper gegen das C-terminale Peptid GMITKQAKK verwendet (PP1 $\gamma$ 1-Antikörper). Der Antikörper gegen das Peptid ADLDKLNIDSIIQRLLEVRC erkennt den N-Terminus und kann daher beide Isoformen detektieren (PP1 $\gamma$ -Antikörper). Im N-Terminus der PP1 $\gamma$ -Isoformen ist gegenüber diesem Peptid nur Leucin gegen Isoleucin und Cystein gegen Glycin ausgetauscht (Abb. 4).

MAD	I	D	K	L	N	I	D	S	I	I	Q	R	L	L	E	V	R	G	S	K	P	G	K	N	V	Q	L		30	
Q	E	N	E	I	R	G	L	C	L	K	S	R	E	I	F	L	S	Q	P	I	L	L	E	L	E	A	P	L	K	60
I	C	G	D	I	H	G	Q	Y	Y	D	L	L	R	L	F	E	Y	G	G	F	P	P	E	S	N	Y	L	F	L	90
G	D	Y	V	D	R	G	K	Q	S	L	E	T	I	C	L	L	L	A	Y	K	I	K	Y	P	E	N	F	F	L	120
L	R	G	N	H	E	C	A	S	I	N	R	I	Y	G	F	Y	D	E	C	K	R	R	Y	N	I	K	L	W	K	150
T	F	T	D	C	F	N	C	L	P	I	A	A	I	V	D	E	K	I	F	C	C	H	G	G	L	S	P	D	L	180
Q	S	M	E	Q	I	R	R	I	M	R	P	T	D	V	P	D	Q	G	L	L	C	D	L	L	W	S	D	P	D	210
K	D	V	L	G	W	G	E	N	D	R	G	V	S	F	T	F	G	A	E	V	V	A	K	F	L	H	K	H	D	240
L	D	L	I	C	R	A	H	Q	V	V	E	D	G	Y	E	F	F	A	K	R	Q	L	V	T	L	F	S	A	P	270
N	Y	C	G	E	F	D	N	A	G	A	M	M	S	V	D	E	T	L	M	C	S	F	Q	I	L	K	P	A	E	300
K	K	K	P	N	A	T	R	P	V	T	P	P	R																	314
<u>GMITKQAKK</u>																												315 – 323 : PP1γ1		
VTSGLNPSIQKASNYRNNTVLYE																												315 – 337 : PP1γ2		

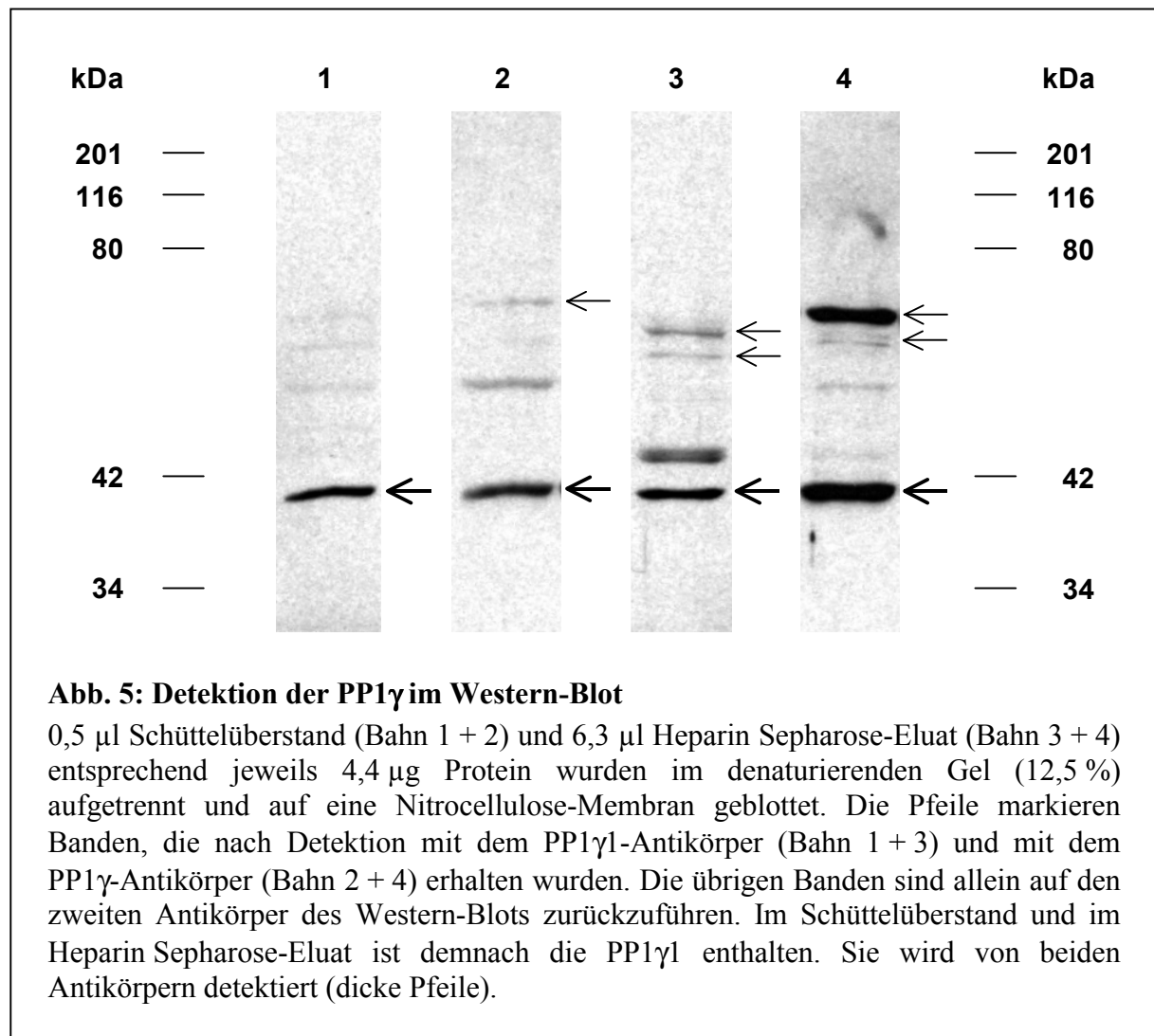
**Abb. 4: Aminosäuresequenz der PP1 $\gamma$ 1 und PP1 $\gamma$ 2 aus dem Rind**

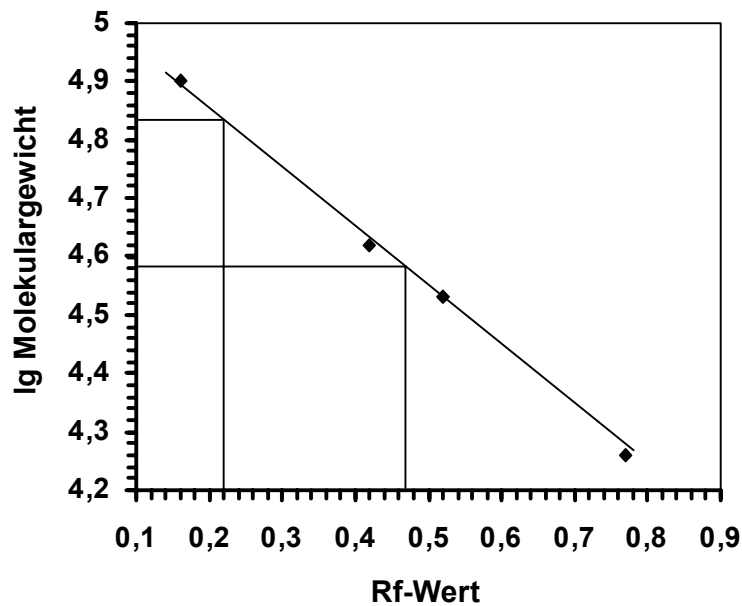
PP1 $\gamma$ 1 und PP1 $\gamma$ 2 unterscheiden sich nur im C-Terminus. Der Antikörper gegen die unterstrichene C-terminale Aminosäuresequenz detektiert nur die PP1 $\gamma$ 1, während der Antikörper gegen den N-Terminus auch die PP1 $\gamma$ 2 detektieren kann. Das Peptid, gegen das dieser Antikörper gebildet wurde, enthielt anstelle von Isoleucin Leucin und statt Glycin Cystein (unterstrichene N-terminale Aminosäuresequenz, ausgetauschte Aminosäuren grau hervorgehoben). Die Aminosäuresequenzen sind aus Anton (1996) entnommen.

Der Retina-Extrakt wurde nach einer abgewandelten Methode zur Gewinnung von Außensegmenten gewonnen (Schnetkamp und Daemen, 1982). Mit diesem Schüttelüberstand wurde nach denaturierender Gelelektrophorese im Western-Blot mit dem PP1 $\gamma$ 1- und dem PP1 $\gamma$ -Antikörper in Übereinstimmung mit dem berechneten Molekulargewicht eine Bande bei etwa 38 kDa erhalten. Weiterhin ergab der PP1 $\gamma$ -Antikörper eine Bande bei 68 kDa (Abb. 5, Bahn 1 + 2; Abb. 6). Die Behandlung der Nitrocellulose-Membran mit Ponceau S fixierte die Proteine und verstärkte diese Signale um etwa 50 %.

Im Rahmen der Charakterisierung der katalytischen Untereinheit der PP1 im Schüttelüberstand (Anton, 1996) wurde die PP1 säulenchromatographisch über die Ionenaustauscher Q-Sepharose und Heparin Sepharose aufgereinigt. Dabei konnte eine Reinigung bezogen auf die Aktivität gegenüber phosphorylierter Phosphorylase um den Faktor 11 beobachtet werden. Aus diesem Grund wurden Q-Sepharose und Heparin Sepharose auch hier im ersten Reinigungsschritt zur Identifizierung von PP1-Komplexen eingesetzt. Die Reinigung erfolgte im Batch-Verfahren. Das Prinzip dieses Verfahrens besteht darin, daß die Säulenmaterialien in der jeweiligen Proteinlösung und den entsprechenden Wasch- und Elutionspuffern suspendiert werden.

Das Eluat der Heparin Sepharose (4.3) ergab nach denaturierender Elektrophorese im Western-Blot mit beiden Antikörpern ebenfalls ein deutliches Signal bei 38 kDa. Die vom PP1 $\gamma$ -Antikörper detektierte 68 kDa-Bande erreichte in diesem Western-Blot die Intensität der 38 kDa-Bande. Desweiteren trat eine Bande bei etwa 60 kDa auf. Auch mit dem PP1 $\gamma$ 1-Antikörper wurde eine schwache Doppelbande bei etwa 60 kDa erhalten (Abb. 5, Bahn 3 + 4).





**Abb. 6: Größenbestimmung der Signale im Western-Blot über SDS-PAGE**

Die Rf-Werte lagen bei 0,47 (PP1 $\gamma$ 1-Bande) und 0,22 (PP1 $\gamma$ -Bande) entsprechend einer Größe von 38 kDa und 68 kDa. Als Markerproteine dienten BSA (80 kDa), Carboanhydrase (42 kDa), Trypsin-Inhibitor (33 kDa) und Lysozym (18 kDa).

Die Reinigung des Schüttelüberstandes im Batch-Verfahren unterschied sich hinsichtlich des Proteingehalts der einzelnen Reinigungsschritte deutlich von der säulenchromatographischen Reinigung (Tab. 1). Der Reinigungseffekt der Q-Sepharose und der Heparin Sepharose wurde nach denaturierender Elektrophorese der gleichen Proteinmenge der entsprechenden Eluate und anschließendem Western-Blot mit dem PP1 $\gamma$ -Antikörper untersucht. Demnach war nur eine Anreicherung des 68 kDa-Proteins in beiden Reinigungsschritten zu beobachten. Das 38 kDa-Protein wurde nur an Q-Sepharose aufgereinigt, während Heparin Sepharose keinen Einfluß zeigte.

Das Eluat der Heparin Sepharose wurde für die Immunpräzipitation der PP1 $\gamma$ 1 (5.5) und die Aufreinigung des 68 kDa-Proteins (5.8) verwendet.

	Säulenchromatographie		Batch-Verfahren	
	Protein (mg)	Ausbeute (%)	Protein (mg)	Ausbeute (%)
Schüttelüberstand	211	100	722	100
Q-Sepharose-Eluat	99	47	144	20
Heparin Sepharose-Eluat	6	3	43	6

**Tab. 1: Säulenchromatographie und Batch-Verfahren im Vergleich**

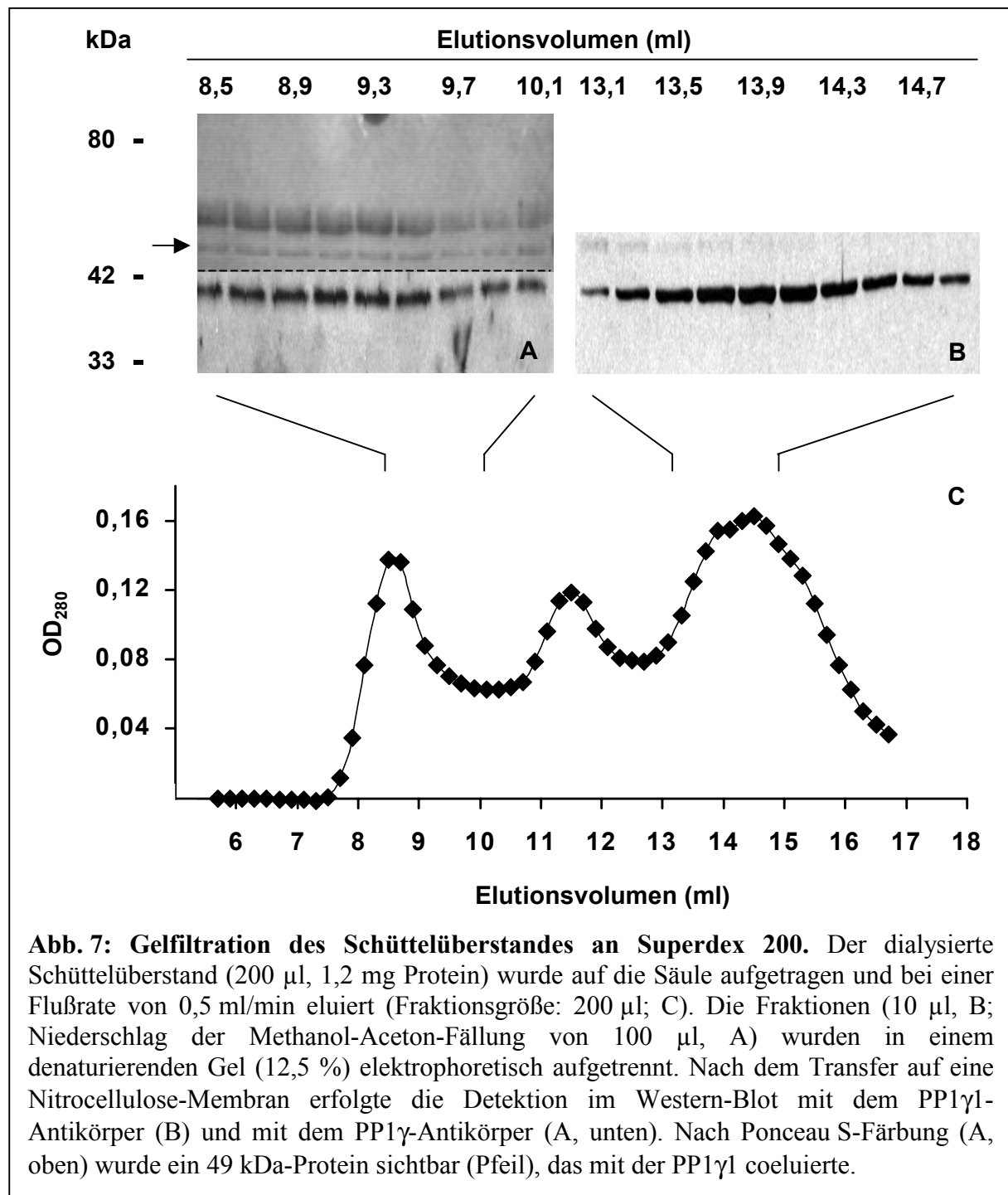
Das Batch-Verfahren wurde wie unter 4.3 beschrieben durchgeführt, die Angaben zur Säulenchromatographie stammen aus Anton (1996). Der Schüttelüberstand wurde in beiden Ansätzen aus 80 Rinderretinae gewonnen.

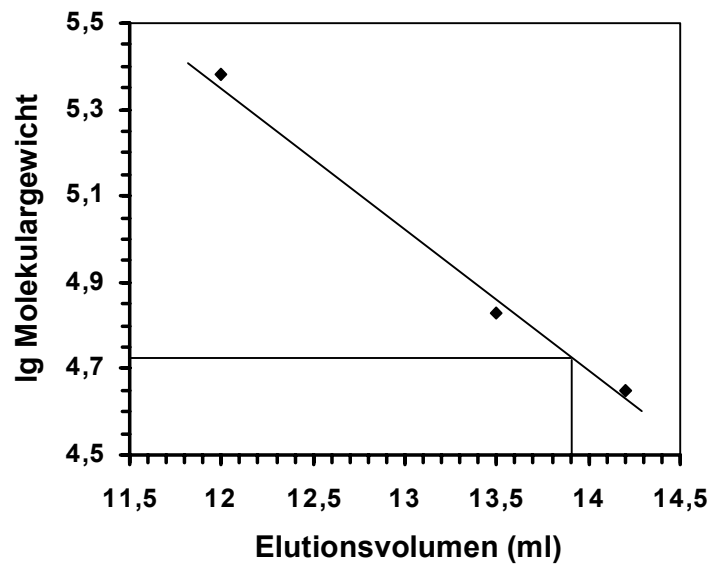
## 5.2 Nachweis von Komplexen der PP1 $\gamma$ l

Ziel der Gelfiltration des Schüttelüberstandes war der Nachweis von Komplexen der PP1 $\gamma$ l und Bestimmung ihrer nativen Größe. Vor dem Auftrag auf die Säule mußte die Zuckerkonzentration verringert werden. Die Umpufferung erfolgte mittels Dialyse. Dadurch wurde die Viskosität des Schüttelüberstandes verringert und eine Beeinträchtigung der Trennleistung der Superdex 200 vermieden. Anschließend wurde die dialysierte Lösung filtriert (0,22  $\mu$ m Porendurchmesser). Die Verteilung der PP1 $\gamma$ l in den Fraktionen der Gelfiltration wurde im Western-Blot nach denaturierender Elektrophorese ermittelt. 10  $\mu$ l der einzelnen Fraktionen ergaben im Western-Blot mit dem PP1 $\gamma$ l-Antikörper eine deutliche 38 kDa-Bande mit der größten Intensität bei einem Elutionsvolumen von 13,8 – 14,0 ml (58 – 50 kDa; Abb 7, B; Abb. 8). Nach Auftrag des Niederschlags der Methanol-Aceton-Fällung von 100  $\mu$ l der Fraktionen wurde mit diesem Antikörper auch eine schwache 38 kDa-Bande außerhalb des optimalen Trennbereichs der Gelfiltrationssäule (> 600 kDa) detektiert. Dieses Signal konnte durch Verwendung des PP1 $\gamma$ - anstelle des PP1 $\gamma$ l-Antikörpers verstärkt werden. In diesem Bereich färbte Ponceau S auf der Nitrocellulose-Membran ein Protein an,

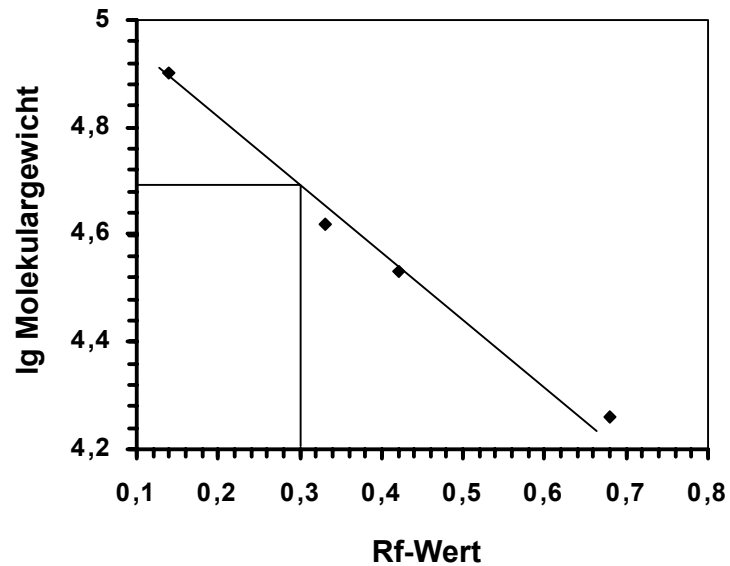


das mit der PP1 $\gamma$ 1 von der Gelfiltrationssäule co-eluierte (Abb. 7, A). Seine Größe wurde mit etwa 49 kDa bestimmt (Abb. 9). Im Gel lief dieses Protein getrennt von anderen Banden, so daß eine Identifizierung über Teilsequenzierung möglich war.





**Abb. 8: Größenbestimmung der Signale im Western-Blot an Superdex 200.** Das Elutionsvolumen von 13,9 ml entspricht einer Größe von 54 kDa. Die Eichung wurde durchgeführt mit Katalase (240 kDa), BSA (68 kDa) und Ovalbumin (45 kDa).



**Abb. 9: Größenbestimmung der mit der PP1 $\gamma$  co-eluiierenden Bande über SDS-PAGE.** Der Rf-Wert von 0,3 entspricht einer Größe von 49 kDa. Als Markerproteine dienten BSA (80 kDa), Carboanhydrase (42 kDa), Trypsin-Inhibitor (33 kDa) und Lysozym (18 kDa).

### 5.3 Actin als Bindungspartner der PP1 $\gamma$ 1?

Bei der Gelfiltration des Schüttelüberstandes an Superdex 200 wurde die PP1 $\gamma$ 1 in den hochmolekularen Fraktionen außerhalb des Trennbereichs (> 600 kDa) mittels Western-Blot nachgewiesen. Ponceau S-Färbung der Membran zeigte ein 49 kDa-Protein, das mit der PP1 $\gamma$ 1 von der Superdex 200-Säule co-eluierte (5.2). Aufgrund dieser Co-Elution kam das 49 kDa-Protein als Bindungspartner der PP1 $\gamma$ 1 in Betracht und sollte durch Ansequenzierung (Dr. Roland Kellner, Merck, Darmstadt) identifiziert werden. Das Protein wurde aus einem Gel ausgeschnitten, mit Proteasen verdaut und die eluierten Peptide mittels Massenspektrometrie (MALDI-MS) sequenziert.

Die Aminosäuresequenzen von 3 Peptiden dieses Proteins mit insgesamt 64 Aminosäuren wurden bestimmt. Diese Sequenzen konnten in den Datenbanken dem Actin IB aus dem Seeigel *Strongylocentrotus purpuratus* (41,8 kDa, Vorstufe) zugeordnet werden (Abb. 10). Es wurden weitere Sequenzen erhalten, die nicht in diesem Actin vorkommen. Dies könnte auf Spezies-spezifische Unterschiede zurückzuführen sein. Desweiteren besteht die Möglichkeit, daß die ausgeschnittene Bande neben Actin noch weitere Proteine enthält. Das Auftreten von Actin in den hochmolekularen Fraktionen ist ein Hinweis darauf, daß es wahrscheinlich als Filament vorliegt. Die Bindung von der PP1 $\gamma$ 1 an Actin-Filamente könnte die Co-Elution erklären.

<b>M C D D D V A A L V I D N G S G M V K A G F A G D D A P R A V F P S I V G R P R</b>	40
<b>H Q G V M V G M G Q K D S Y V G D E A Q S K R G I L T L K Y P M E H G I V T N W</b>	80
<b>D D M E K I W H H T F Y N E L R V A P E E H P V L L T E A P L N P K A N R E K M</b>	120
<b>T Q I M F E T F N S P A M Y V A I Q A V L S L Y A S G R T T G I V F D S G D G V</b>	160
<b>S H T V P I Y E G Y A L P H A I L R L D L A G R D L T D Y L M K I L T E R <u>G Y S</u></b>	200
<b><u>F T T T A E R E I V R D I K E K L C Y V A L D F E Q E M Q T A A S S S S L E K S</u></b>	240
<b><u>Y E L P D G Q V I T I G N E R F R C P E A L F Q P A F L G M E S A G I H E T C Y</u></b>	280
<b>N S I M K C D V D I R K D L Y A N T V L S G G S T M F P G I A D R M Q K E I T A</b>	320
<b>L A P P T M K I K I I A P P E R K Y S V C I G G S I L A S L S T F Q Q M W I S K</b>	360
<b><u>Q E Y D E S G P S I V H R K C F</u></b>	376

**Abb. 10: Aminosäuresequenz von Actin IB aus dem Seeigel** (Zugriffsnummer P53473). Die unterstrichenen Sequenzabschnitte wurden mittels Massenspektrometrie bestimmt.

## **5.4 Lokalisierung der PP1 $\gamma$ 1 in der Retina**

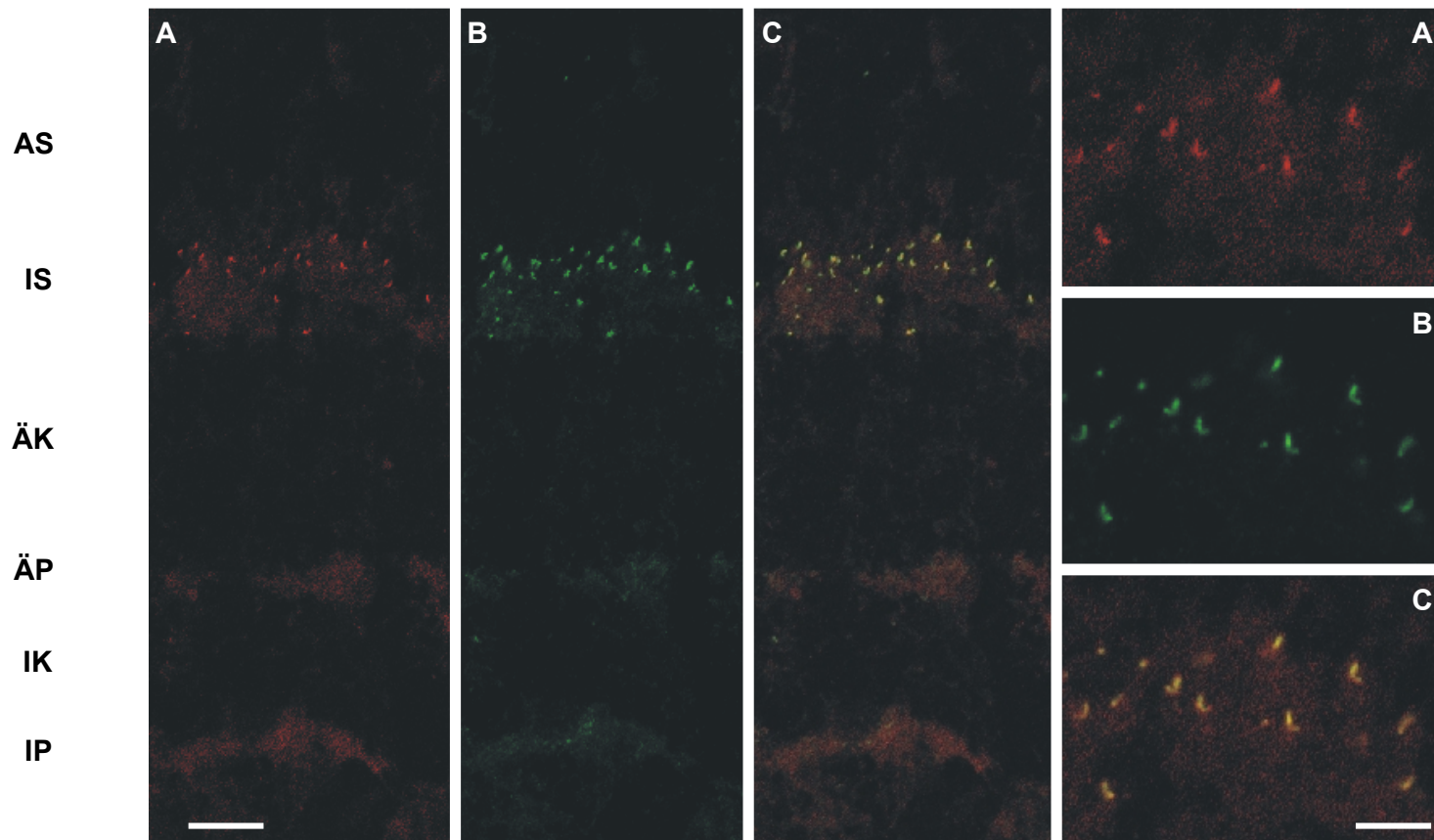
### **5.4.1 Immunhistochemische Lokalisierung der PP1 $\gamma$ 1 in der Retina**

Die Lokalisierung der PP1 $\gamma$ 1 in der Retina wurde mit Hilfe indirekter Immunfluoreszenz untersucht. Diese Arbeiten wurden von mir in der Arbeitsgruppe von Professor Wolfrum, Institut für Zoologie, Johannes-Gutenberg-Universität in Mainz durchgeführt.

Kryostatschnitte von der Retina des Rindes (10  $\mu$ m Dicke) wurden mit dem PP1 $\gamma$ 1-Antikörper inkubiert. Die Ergebnisse mittels konventioneller Fluoreszenzmikroskopie sowie konfokaler Laserscanning-Mikroskopie zeigen, daß die PP1 $\gamma$ 1 in der Photorezeptorzellschicht der Retina im Übergang zwischen Außensegment und Innensegment lokalisiert ist.

Zur genaueren subzellulären Lokalisierung erfolgte eine Doppelmarkierung mit Centrin. Centrin ist als molekularer Marker für das Verbindungscilium und den sogenannten Basalkörperkomplex anerkannt (Wolfrum, 1995; Liu et al., 1997; Wolfrum und Salisbury, 1998). Der verwendete Centrin-Antikörper ist bereits gut charakterisiert (Baron et al., 1992). Die Kryostatschnitte wurden über Nacht mit einem Gemisch aus dem Centrin-Antikörper (aus der Maus) und dem PP1 $\gamma$ 1-Antikörper (aus dem Kaninchen) inkubiert. Es folgte die Inkubation mit dem anti-Maus-Antikörper (FITC-gekoppelt) gemischt mit dem anti-Kaninchen-Antikörper (Rhodamin-gekoppelt). Übereinanderlagerung der Rhodamin- und FITC-Immunfluoreszenz zeigte die Co-Lokalisation von PP1 $\gamma$ 1 und Centrin (Abb. 11). Mit Hilfe dieser Doppelmarkierung konnte somit an Rinderretinae gezeigt werden, daß die PP1 $\gamma$ 1 in der Photorezeptorzelle im Verbindungscilium und am Basalkörperkomplex lokalisiert ist. Diese Lokalisierung konnte auch an Kryostatschnitten der Mäuseretina (Stamm C57BL/6J) nachgewiesen werden.

Mit dem Kontrollserum anstelle des PP1 $\gamma$ 1-Antikörpers wurden die Signale im Verbindungscilium und am Basalkörperkomplex nicht erhalten. Lediglich die äußere und innere plexiforme Schicht zeigte eine schwache Fluoreszenz. Desweiteren ergab die FITC-Fluoreszenz des anti-Maus-Antikörpers kein Signal auf dem Kanal zur Detektion der Rhodamin-Fluoreszenz des anti-Kaninchen-Antikörpers und umgekehrt.



**Abb. 11: Immunhistochemische Lokalisierung der PP1 $\gamma$  in der Retina**

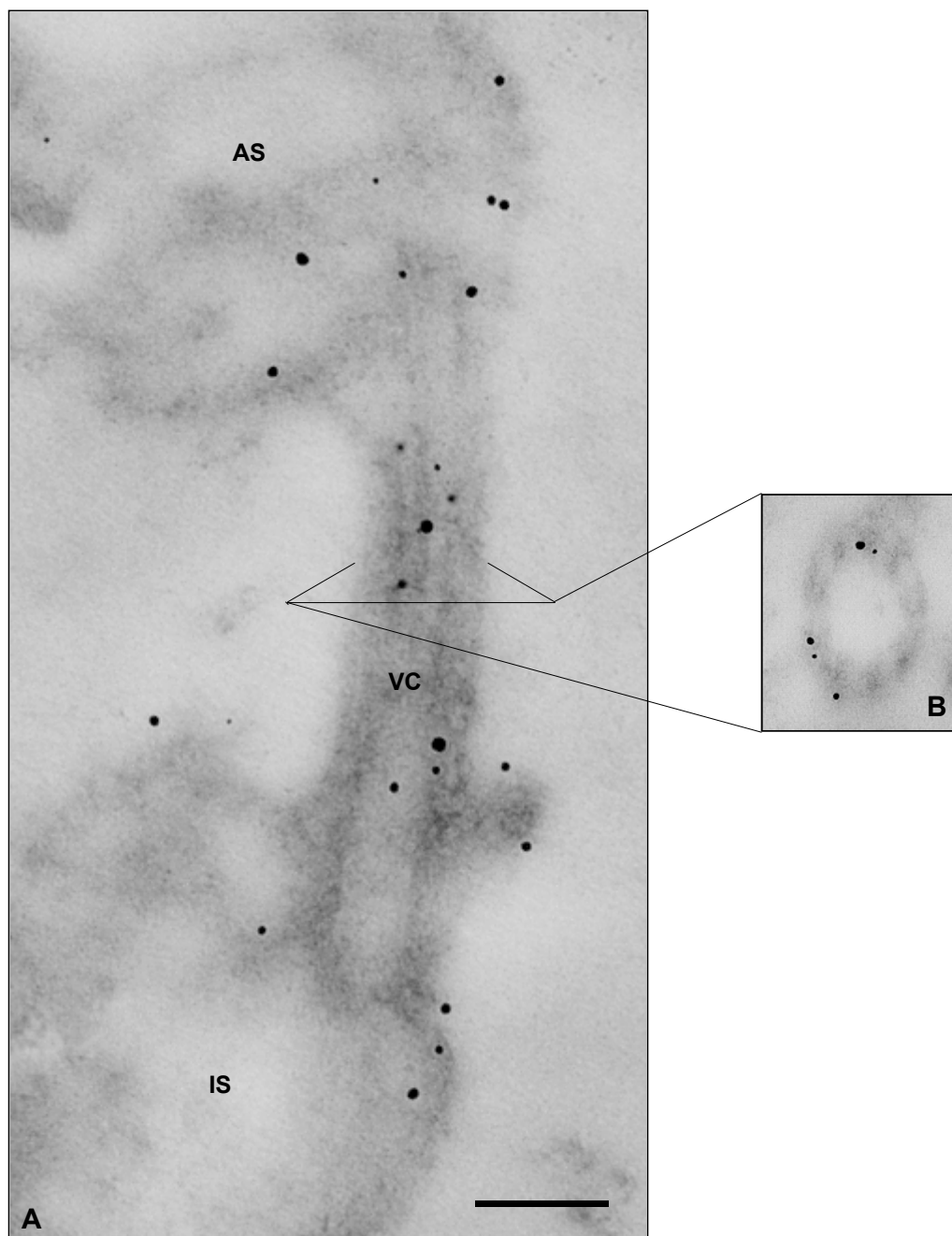
In A) bis C) ist jeweils derselbe Bereich eines Längsschnittes der Rinderretina gezeigt mit der Detektion von PP1 $\gamma$  mittels Rhodamin-Immunfluoreszenz (A), von Centrin mittels FITC-Immunfluoreszenz (B) und der Übereinanderlagerung beider Immunfluoreszenzen (C). In A') bis C') ist der entsprechende zweifach vergrößerte Ausschnitt im Bereich des Verbindungsciliums abgebildet. Die Aufnahmen wurden mit einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop erstellt.

Außensegment (AS), Innensegment (IS), äußere Körnerschicht (ÄK), äußere plexiforme Schicht (ÄP), innere Körnerschicht (IK), innere plexiforme Schicht (IP), Maßstab = 10  $\mu$ m/5  $\mu$ m

#### **5.4.2 Subzelluläre Lokalisierung der PP1 $\gamma$ 1 in der Retina**

Die durch indirekte Immunfluoreszenz gewonnenen Ergebnisse konnten durch elektronenoptische Untersuchungen bestätigt werden. Zur subzellulären Lokalisierung der PP1 $\gamma$ 1 in der Photorezeptorzelle wurden Immunogoldmarkierungen an Ultradünnschnitten der Rinderretina (60 nm Dicke) durchgeführt. Diese Immun-Elektronenmikroskopischen Untersuchungen wurden wiederum in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Professor Wolfrum, Institut für Zoologie, Johannes-Gutenberg-Universität in Mainz durchgeführt. Der PP1 $\gamma$ 1-Antikörper wurde in einer Verdünnung von 1 : 1.000 eingesetzt, der sekundäre anti-Kaninchen-Antikörper (aus Ziege) war zur elektronenoptischen Visualisierung mit 10 nm kolloidalem Gold (Biotrend, Köln) markiert (Verdünnung 1 : 100). Die genaue Verfahrensweise ist in Wolfrum (1995) beschrieben.

Die Analyse der Schnitte durch die Retina bestätigte zunächst, daß die Expression der PP1 $\gamma$ 1 in der Retina auf die Photorezeptorzellen beschränkt ist. In der Photorezeptorzelle sind vor allem das Verbindungscilium und distal davon die Basis des Außensegments markiert (Abb. 12, A). Zudem reagiert der PP1 $\gamma$ 1-Antikörper mit dem Basalkörperkomplex im Innensegment an der Basis des Verbindungsciliums. Desweiteren weisen Immunogoldmarkierungen von Transversalschnitten durch das Verbindungscilium darauf hin, daß die PP1 $\gamma$ 1 im subciliären Kompartiment zwischen Axonem und der Cilienmembran lokalisiert ist (Abb. 12, B). Mit dem Kontrollserum anstelle des PP1 $\gamma$ 1-Antikörpers wurden die beschriebenen Signale nicht erhalten.



**Abb. 12: Subzelluläre Lokalisierung der PP1 $\gamma$ 1 in den Photorezeptorzellen der Rinderretina.** Immunogoldmarkierung der PP1 $\gamma$ 1 in einem Längsschnitt einer Stäbchen-Photorezeptorzelle (A) und in einem Querschnitt durch das Verbindungscilium (B). Außensegment (AS), Innensegment (IS), Verbindungscilium (VC). Maßstab = 150 nm

## 5.5 Immunpräzipitation der PP1 $\gamma$ 1

Zur Identifizierung der mit der PP1 $\gamma$ 1 assoziierten Proteine wurde die Immunpräzipitation etabliert. Das Heparin Sepharose-Eluat (4.3) wurde mit dem PP1 $\gamma$ 1-Antikörper (Fällungs-Antikörper) inkubiert, der gebildete Antigen-Antikörper-Komplex an Protein A-Sepharose gebunden und abzentrifugiert. Der Niederschlag wurde gewaschen und anschließend extrahiert. Nach Auftrennung der extrahierten Proteine in einer denaturierenden Gelelektrophorese und Transfer auf eine Nitrocellulose-Membran wurde die gefällte PP1 $\gamma$ 1 im Western-Blot detektiert (Abb. 13). Um sicherzustellen, daß die PP1 $\gamma$ 1 allein über den Antikörper und nicht über unspezifische Wechselwirkung mit Protein A-Sepharose oder anderen Immunglobulinen des Serums gefällt wurde, diente die Immunpräzipitation mit Kontrollserum als Kontrolle (Abb. 13, Bahn 2, 4, 6).

Fällung mit dem PP1 $\gamma$ 1-Antikörper (aus Kaninchen), Extraktion mit denaturierendem Probenpuffer und Detektion der immunpräzipitierten PP1 $\gamma$ 1 mit demselben Antikörper im Western-Blot führte zu einem starken Hintergrund: Der zweite Antikörper detektierte im Western-Blot nicht nur die schwere Kette des Fällungs-Antikörpers (etwa 50 kDa), sondern verursachte darüberhinaus intensive Banden auf der Höhe des zu erwartenden PP1 $\gamma$ 1-Signals (Abb. 13, Bahn 1 + 2). Diese Signale wurden auch erhalten, wenn der erste Antikörper im Western-Blot weggelassen wurde. Eine Beurteilung dieser Art von Immunpräzipitation war unmöglich.

Erfolgte die Detektion im Western-Blot nicht mit dem PP1 $\gamma$ 1-Antikörper aus dem Kaninchen sondern mit dem PP1 $\gamma$ -Antikörper aus der Ziege, nahm der Hintergrund insgesamt deutlich ab, die störenden Banden unterhalb von 50 kDa waren nur noch schwach zu erkennen. Die PP1 $\gamma$ 1 konnte selektiv gefällt werden: Während mit dem PP1 $\gamma$ 1-Antikörper als Fällungs-Antikörper ein starkes Signal bei etwa 38 kDa im Western-Blot erhalten wurde, war mit dem Kontrollserum nur eine sehr schwache Bande zu erkennen (Abb. 13, Bahn 3 + 4). Die PP1 $\gamma$ 1 konnte nach der Immunpräzipitation noch im Heparin Sepharose-Eluat nachgewiesen werden, die Fällung war demnach nicht quantitativ. Zur Erhöhung der gefällten PP1 $\gamma$ 1-Menge wurde das Heparin Sepharose-Eluat mittels Ultrafiltration achtfach konzentriert. Eine weitere



Konzentrierung führte bei unveränderten Waschbedingungen zu einer stärkeren unspezifischen Fällung und wurde daher vermieden. Die Inkubation mit dem Fällungs-Antikörper konnte ohne Beeinträchtigung der Immunpräzipitation von 1 h auf 14 h verlängert werden.

Eine weitere Verringerung des Hintergrundes wurde durch Extraktion mit TRIS-Puffer (10 mM, pH 8) erreicht: Im Vergleich zum denaturierenden Probenpuffer wurden weniger Immunglobuline von der Protein A-Sepharose eluiert, so daß die Intensität der 50 kDa-Bande deutlich abnahm. Das Ergebnis der Immunpräzipitation wurde dadurch nicht beeinträchtigt (Abb. 13, Bahn 5 + 6).

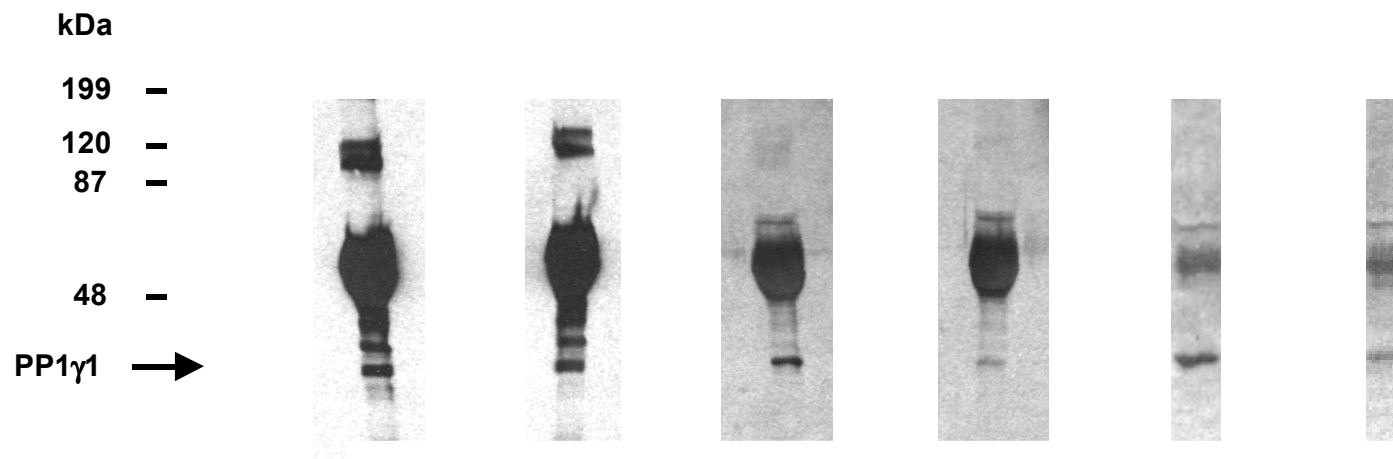
Es gab drei Hinweise, daß die PP1 $\gamma$ 1 mit Myosin VIIa assoziiert ist: Dieses unkonventionelle Myosin wurde im Verbindungscilium zwischen Axonem und Zellmembran lokalisiert (Liu et al., 1997) und weist die Sequenz R/K-V/I-x-F an zwei Positionen auf. Dieses Motiv ist in vielen PP1-bindenden Proteinen zu finden (Egloff et al., 1997). Desweiteren war Myosin VIIa im Heparin Sepharose-Eluat per Western-Blot nachweisbar. Hierzu wurden 15  $\mu$ l des achtfach konzentrierten Heparin Sepharose-Eluats auf ein denaturierendes Gel aufgetragen. Da Myosin VIIa als eine Bande bei etwa 230 kDa erscheint (Wolfrum et al., 1998), wurde ein 6 %iges Gel verwendet und der anschließende Transfer auf eine Nitrocellulose-Membran in Gegenwart von SDS (Transferpuffer 2) über 2 h bei 25 V durchgeführt.

Um zu prüfen, ob die PP1 $\gamma$ 1 mit dem Myosin VIIa assoziiert ist, wurde die Immunpräzipitation unter Verwendung des TRIS-Puffers (10 mM, pH 8) als Extraktionsmittel durchgeführt. Bei dieser Methode müssen die zu präzipitierenden Proteine mit Methanol-Aceton fällbar sein. Wie im Western-Blot gezeigt werden konnte, werden die PP1 $\gamma$ 1 und Myosin VIIa nahezu quantitativ gefällt.

Um im Anschluß an die Immunpräzipitation die PP1 $\gamma$ 1 und Myosin VIIa mittels Western-Blot detektieren zu können, wurde ein denaturierendes Gel mit diskontinuierlichem Gradienten verwendet: Das Trenngel enthielt in der unteren Hälfte 12,5 % und in der oberen Hälfte 6 % Acrylamid/Bisacrylamid. Auf dieses Gel wurden der Extrakt der Immunpräzipitation, 15  $\mu$ l des achtfach konzentrierten Heparin Sepharose-Eluats (Kontrollbahn) und vorgefärbte

Markerproteine aufgetragen. Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die Proteine aus dem 12,5 %igen Gel unter Verwendung des Transferpuffers 1 (ohne SDS) über 1 h bei 10 V auf eine Nitrocellulose-Membran geblottet und anschließend mit dem PP1 $\gamma$ -Antikörper detektiert. Aus dem 6 %igen Gel erfolgte der Transfer wie oben beschrieben mit dem SDS-haltigen Transferpuffer 2 über 2 h bei 25 V, detektiert wurde mit dem Myosin VIIa-Antikörper. Die Membranen wurden so auf der Glasplatte fixiert, daß die Banden der vorgefärbten Markerproteine eine Bahn bildeten. Während auf der Kontrollbahn die PP1 $\gamma$ 1 und Myosin VIIa detektiert wurden, war in der Bahn des Extrakts der Immunpräzipitation nur die PP1 $\gamma$ 1, nicht Myosin VIIa vorhanden. Demnach wurden die PP1 $\gamma$ 1 und Myosin VIIa nicht co-immunpräzipitiert. Sie waren unter den gewählten Bedingungen der Immunpräzipitation nicht miteinander verbunden.

	1	2	3	4	5	6
Fällungs-Ak: anti-	PP1 $\gamma$ 1	–	PP1 $\gamma$ 1	–	PP1 $\gamma$ 1	–
1. Ak: anti-	PP1 $\gamma$ 1	PP1 $\gamma$ 1	PP1 $\gamma$	PP1 $\gamma$	PP1 $\gamma$	PP1 $\gamma$
2. Ak: anti-	Kaninchen	Kaninchen	Ziege	Ziege	Ziege	Ziege
Extraktion mit	Probenpuffer	Probenpuffer	Probenpuffer	Probenpuffer	TRIS-Puffer	TRIS-Puffer



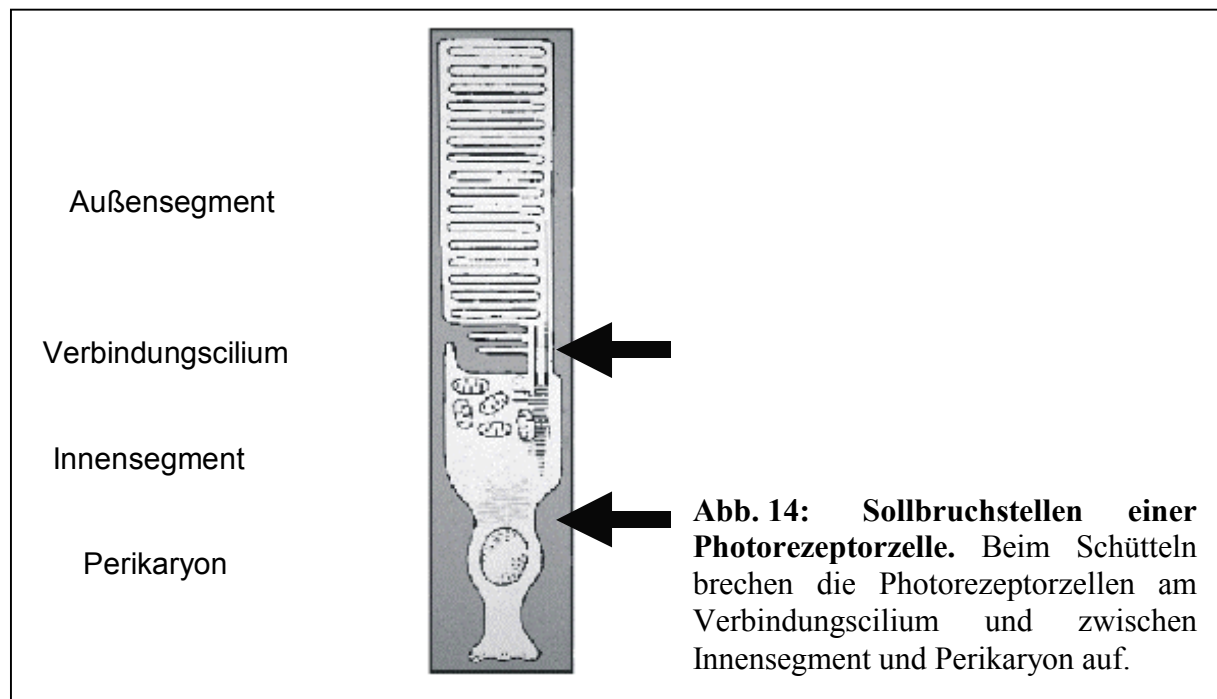
**Abb. 13: Immunpräzipitation der PP1 $\gamma$ 1**

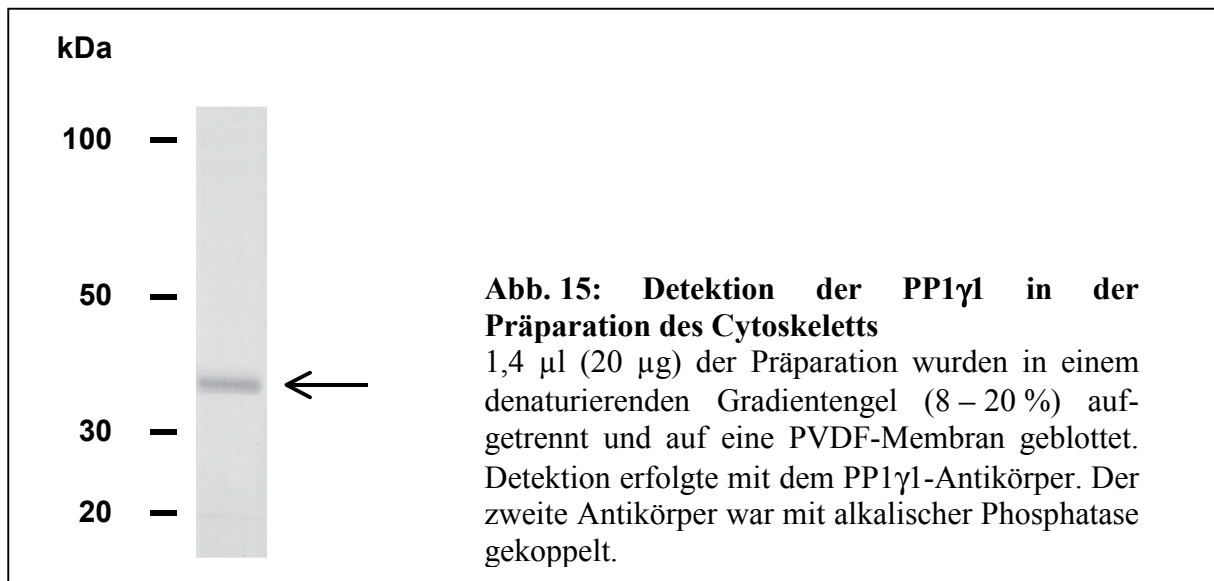
Das Heparin Sepharose-Eluat (achtfach konzentriert; 3,15 mg/ml) wurde mit dem Fällungs-Antikörper inkubiert und der gebildete Antigen-Antikörper-Komplex an Protein A-Sepharose gebunden, abzentrifugiert und gewaschen. Nach Auftrennung der extrahierten Proteine in einem denaturierenden Gel (10 %) und Transfer auf eine Nitrocellulose-Membran erfolgte die Detektion mit den angegebenen ersten und zweiten Antikörpern. Die Bahnen 2, 4 und 6 zeigen das Ergebnis der Immunpräzipitation mit Kontrollserum (–). Ak = Antikörper

## 5.6 Assoziation der PP1 $\gamma$ 1 mit dem Cytoskelett

Um festzustellen, ob die PP1 $\gamma$ 1 im detektierten Bereich der Photorezeptorzelle mit dem Cytoskelett assoziiert ist, wurde dieses Cytoskelett isoliert und nach denaturierender Elektrophorese im Western-Blot mit dem PP1 $\gamma$ 1-Antikörper detektiert.

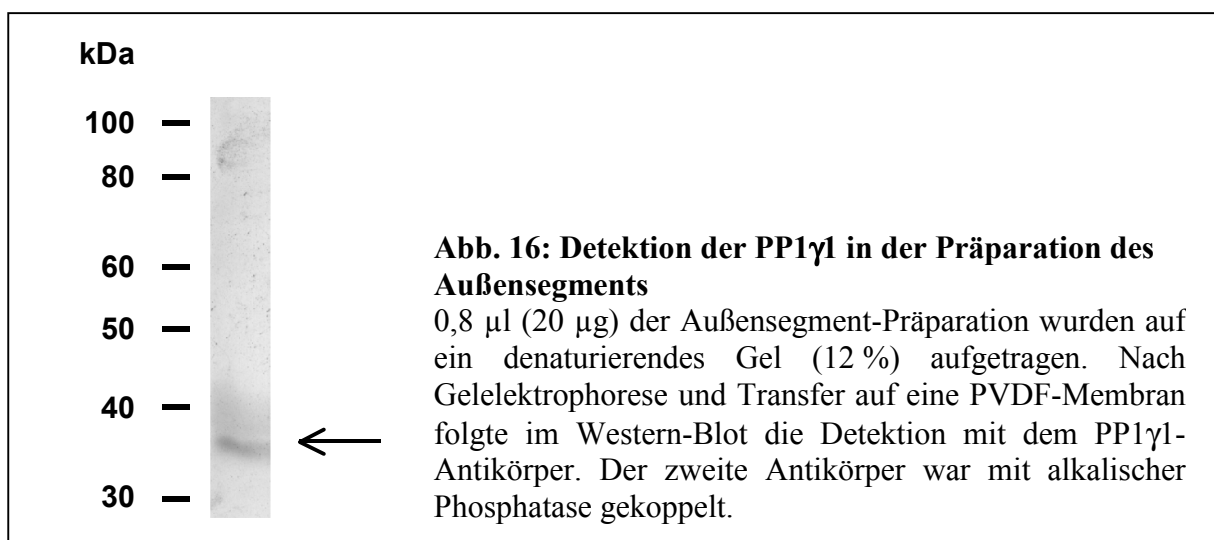
Durch Schütteln der Retinae im HERT-Puffer brechen die Photorezeptorzellen am Verbindungscilium und zum Teil am Übergang zwischen Innensegment und Perikaryon auf (Abb. 14). Die Fragmente wurden von den übrigen Bestandteilen der Retina über Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation abgetrennt. Anschließend wurden alle Bestandteile dieser zellulären Fragmente, die nicht fest mit dem Cytoskelett verbunden sind, durch Behandlung mit dem Cytoskelett-Extraktionspuffer entfernt. Der Nachweis der PP1 $\gamma$ 1 in dieser Präparation zeigt, daß sie fest mit dem Cytoskelett des Cilienapparates verbunden ist (Abb. 15).





## 5.7 Detektion der PP1 $\gamma$ 1 in der Außensegment-Präparation

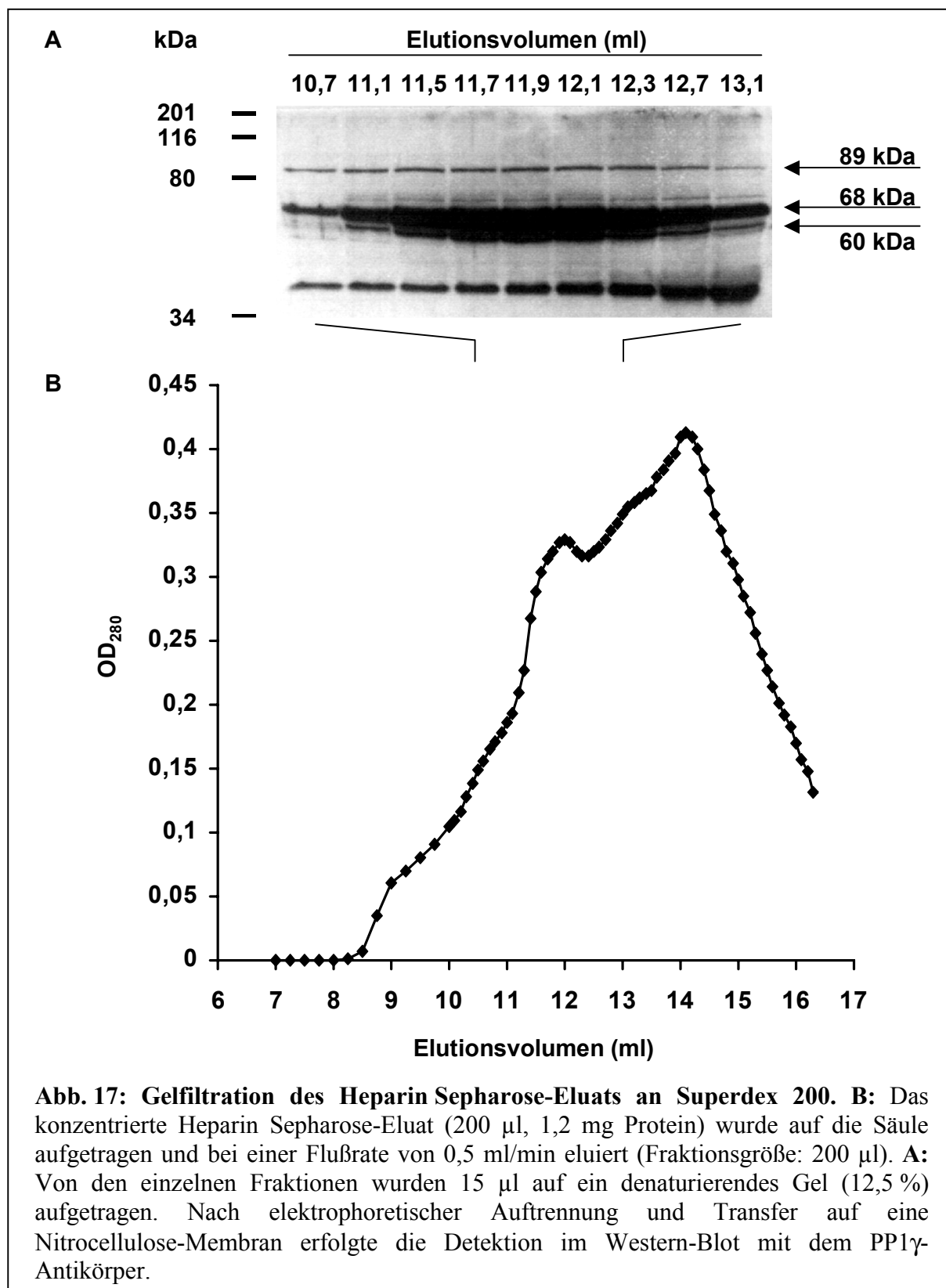
Aktivitätsmessungen ließen in der Vergangenheit die Anwesenheit der PP1 im Außensegment der Photorezeptorzelle vermuten (Fowles und Akhtar, 1989). Daher wurden die Außensegmente wie unter 4.2.2 beschrieben aufgereinigt. Nach denaturierender Elektrophorese konnte die PP1 $\gamma$ 1 mittels Western-Blot in der Außensegment-Präparation nachgewiesen werden (Abb. 16). Bei der aktiven PP1 könnte es sich demnach um diese Isoform handeln.

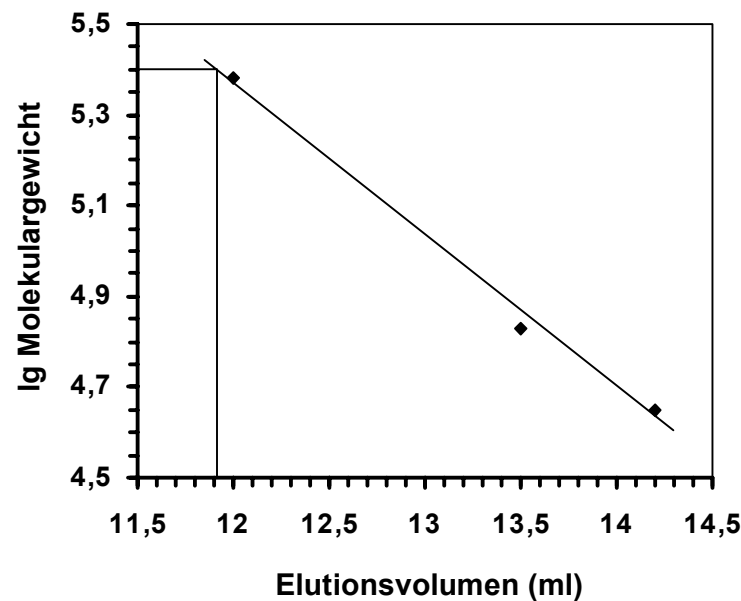


## **5.8 Reinigung eines vom PP1 $\gamma$ -Antikörper detektierten 68 kDa-Proteins**

### **5.8.1 Gelfiltration**

Im Heparin Sepharose-Eluat wurde nach denaturierender Elektrophorese im Western-Blot vom PP1 $\gamma$ -Antikörper ein 68 kDa-Protein detektiert (5.1). Zur weiteren Aufreinigung dieses Proteins diente die Gelfiltration. Vor dem Auftrag wurde das Heparin Sepharose-Eluat mittels Ultrafiltration konzentriert: 60 ml Eluat wurden auf vier Centriplus-Röhrchen verteilt und auf insgesamt 2,5 ml eingeengt. Die Zentrifugationszeit konnte hierbei durch folgende Maßnahmen auf 5 h begrenzt werden: Durch eine vorgeschaltete Zentrifugation (10 min, 3.860 g, 4 °C) wurde restliche Heparin Sepharose abgetrennt und ein Verstopfen der Centriplus-Röhrchen vermieden. Desweiteren wurde die Zentrifugationszeit verkürzt, indem zwischendurch die Probe umgeschüttelt wurde und indem der Heparin Sepharose-Elutionspuffer kein Glycerin enthielt. Nach der Ultrafiltration wurde das Konzentrat zentrifugiert (1 h, 48.000 g, 4 °C) und auf die Gelfiltrationssäule (Superdex 200) aufgetragen. Die Verteilung des 68 kDa-Proteins in den einzelnen Fraktionen wurde im Western-Blot nach denaturierender Elektrophorese ermittelt. Hier wurde mit dem PP1 $\gamma$ -Antikörper neben der 60 kDa- und der 68 kDa-Bande eine weitere Bande bei etwa 89 kDa erhalten (Abb. 17, A). Diese Proteine eluierten mit einem Maximum bei 11,8 – 12,0 ml entsprechend einer nativen Größe von 230 – 270 kDa (Abb. 18). Das Proteinprofil des Säulenlaufs zeigte hier ein Maximum (Abb. 17, B). Nach Färbung der Nitrocellulose-Membran mit Ponceau S wurde ein Bandenmuster erhalten, in dem das 68 kDa-Protein dominierte. Aus diesen Fraktionen wurde das 68 kDa-Protein über zweidimensionale Gelelektrophorese weiter aufgereinigt (5.8.2).





**Abb. 18: Größenbestimmung der Signale im Western-Blot an Superdex 200.** Das Elutionsvolumen von 11,9 ml entspricht einer Größe von 250 kDa. Diese Größe differiert nur wenig von der des größten als Eichprotein verwendeten Proteins. Die Eichung wurde durchgeführt mit Katalase (240 kDa), BSA (68 kDa) und Ovalbumin (45 kDa).

### 5.8.2 Gelelektrophoretische Aufreinigung

Das 68 kDa-Protein war in den Fraktionen der Gelfiltration des Heparin Sepharose-Eluats in einer für die Ansequenzierung ausreichenden Menge vorhanden, lag aber noch nicht rein vor. Die Silberfärbung diente hier als Reinheitskriterium: Auch nach gelelektrophoretischer Auftrennung in einem 8 %igen Gel wurde keine separate 68 kDa-Bande erhalten. Desweiteren waren mit dem 68 kDa-Protein von der Gelfiltrationssäule co-eluierende Proteine als mögliche Bindungspartner im 230 – 270 kDa-Komplex aufgrund zu vieler Fremdproteine in einem Coomassie-gefärbten Gel nicht zu erkennen. Zur Isolierung des 68 kDa-Proteins und seiner Bindungspartner wurde eine zweidimensionale Gelelektrophorese etabliert: In ihr waren native (1. Dimension) und denaturierende Gelelektrophorese (2. Dimension) kombiniert. Nach elektrophoretischer Abtrennung des 230 – 270 kDa-Komplexes von den

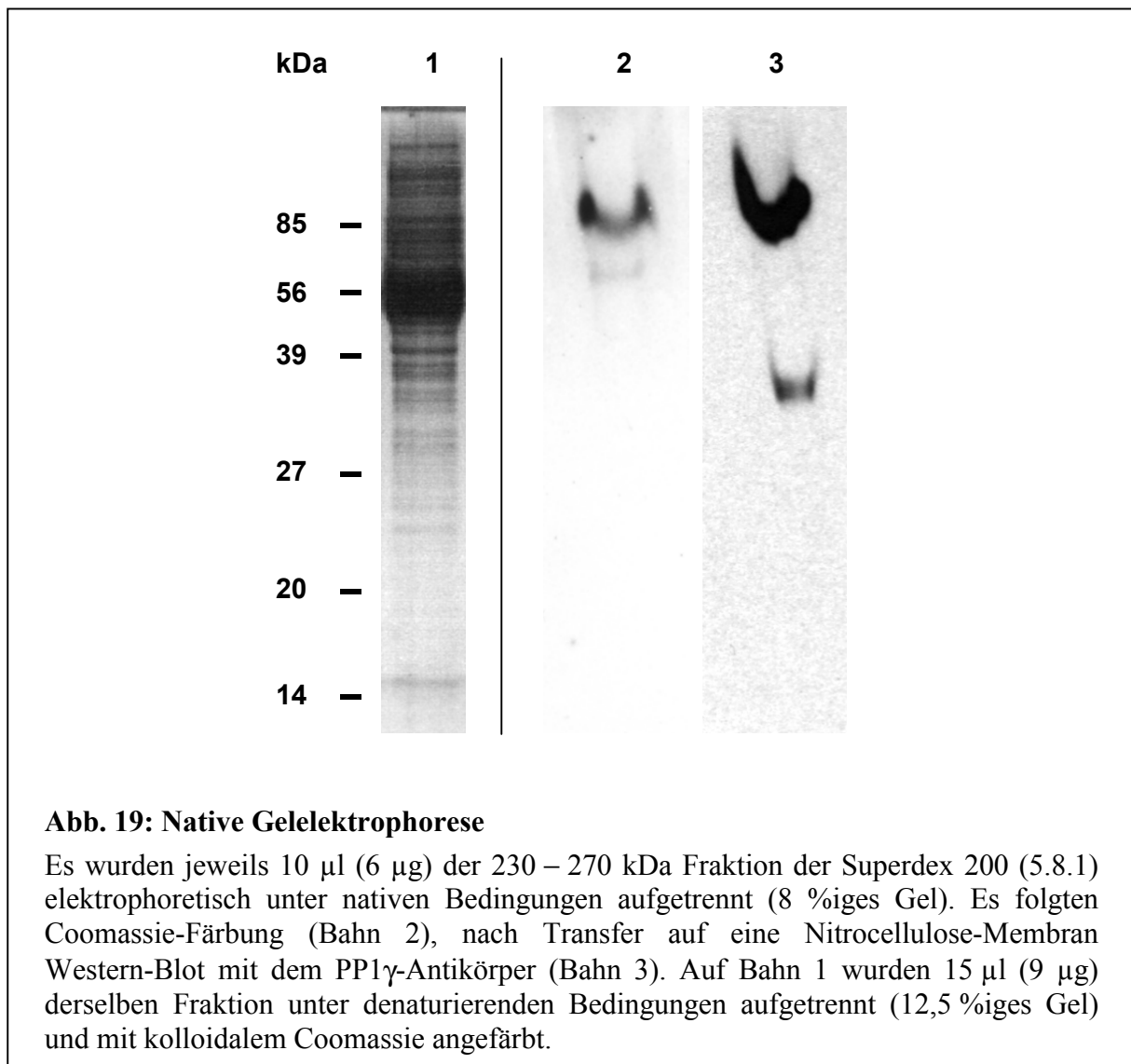


Fremdproteinen in der ersten Dimension unter nativen Bedingungen wurden die Proteine dieses Komplexes in der zweiten Dimension der Größe nach aufgetrennt.

#### **5.8.2.1 Native Gelelektrophorese**

Die Puffer für die native Elektrophorese wurden vom denaturierenden System abgeleitet, indem SDS und 2-Mercaptoethanol weggelassen wurden. Desweiteren wurde die Probe nicht erhitzt und erfolgte die Elektrophorese bei 4 °C unter verminderter Spannung (150 V gegenüber 250 V bei der denaturierenden Elektrophorese).

Nach Coomassie-Färbung waren nur zwei Banden sichtbar, von denen eine im Western-Blot mit dem PP1 $\gamma$ -Antikörper detektiert wurde (Abb. 19). Der exakte Abgleich der Signale im Western-Blot mit der Coomassie-Färbung war über Färbung der Nitrocellulose-Membran mit Ponceau S möglich. Diese nativen Bedingungen wurden in der ersten Dimension der zweidimensionalen Gelelektrophorese verwendet.



### 5.8.2.2 Zweidimensionale Gelelektrophorese

Die Bedingungen der nativen Elektrophorese wurden auf die erste Dimension der zweidimensionalen Elektrophorese übertragen. Da der Probenraum der ersten Dimension bis zu 130  $\mu$ l aufnahm, konnte mehr Gesamtprotein aufgetragen werden als bei der eindimensionalen nativen Gelelektrophorese.

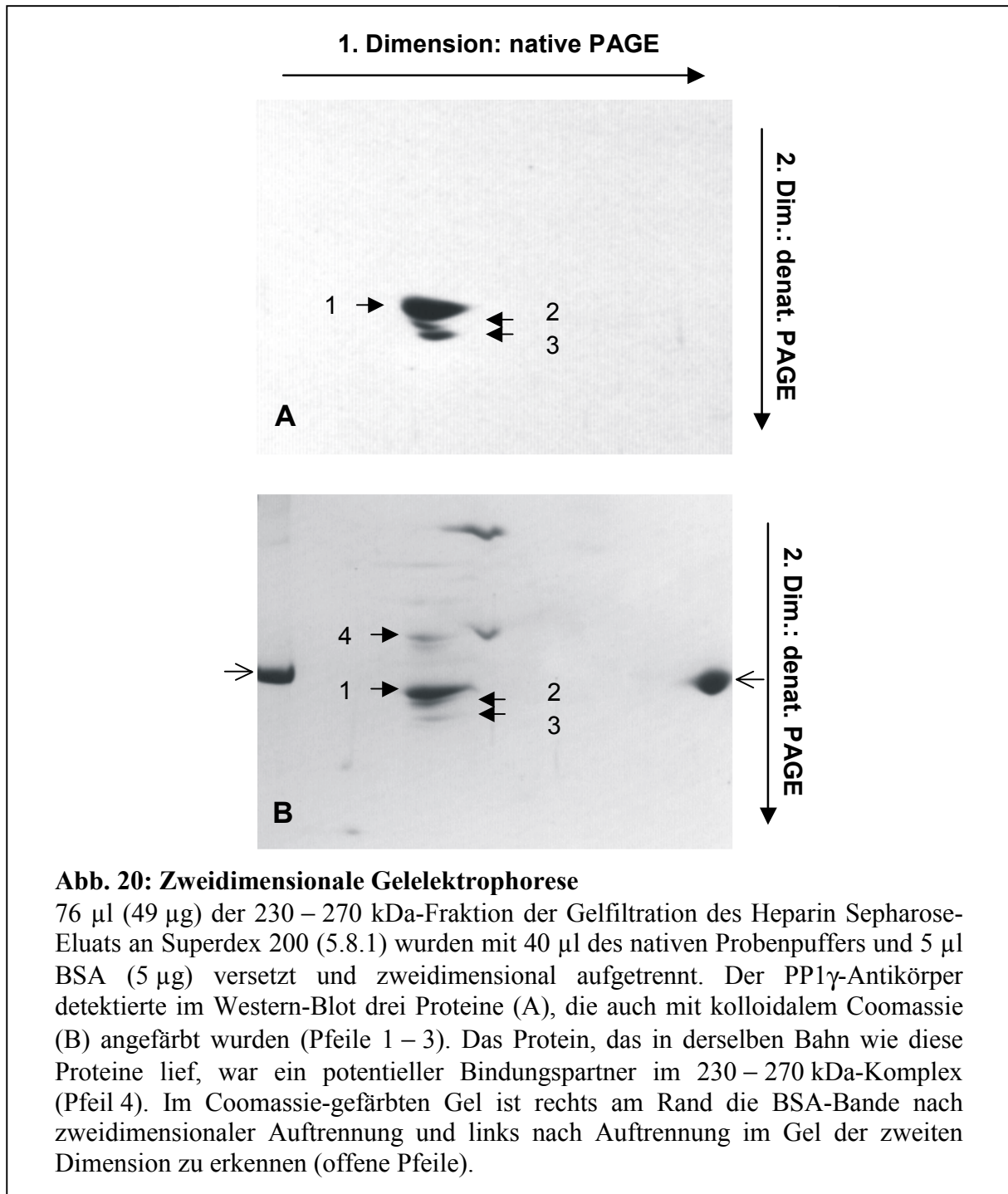
Ein Hauptproblem der zweidimensionalen Gelelektrophorese war der quantitative Transfer der Proteine aus dem Gel der ersten Dimension in das Gel der zweiten Dimension. Das Gel

der ersten Dimension wurde 10 min bei Raumtemperatur im Probenpuffer inkubiert. Dadurch wurde der Proteinverlust begrenzt und die Diffusion des Probenpuffers in das Gel gewährleistet. Desweiteren war das Gel der ersten Dimension 0,4 mm dicker als das der zweiten Dimension, so daß es zwischen den Glasplatten fixiert wurde und der Kontakt zwischen den beiden Gelen während der Elektrophorese in der zweiten Dimension aufrechterhalten werden konnte. Eine leichte Verbreiterung der Banden wurde in Kauf genommen. Der Verlust beim Übergang vom ersten in das zweite Gel konnte durch einen internen Standard kontrolliert werden: BSA (5 µg) wurde der Probe zugesetzt und über erste und zweite Dimension aufgetrennt. Dieselbe Menge BSA wurde direkt in eine Tasche des Gels der zweiten Dimension gegeben. Durch Intensitätsvergleich dieser beiden BSA-Banden im Coomassie-gefärbten Gel konnte die Ausbeute grob abgeschätzt werden. Sie betrug etwa 90 %. Für die Auftrennung der Proteine in der zweiten Dimension wurde dem Probenpuffer sowie dem Gel selbst Harnstoff zugesetzt. Ohne diesen Zusatz wurden keine diskreten Banden erhalten.

Die Proteine der 230 – 270 kDa-Fraktion wurden nach zweidimensionaler Auftrennung mit kolloidalem Coomassie angefärbt. Hierbei stellte sich die geringe Anfärbung des Hintergrundes bei den dicken Gelen der zweiten Dimension als Vorteil heraus. Die Entfärbung dauerte nicht wesentlich länger als bei den 0,5 mm dicken Gelen. Die 68 kDa-Bande wurde in einem zweiten Ansatz im Western-Blot mit PP1 $\gamma$ -Antikörpern identifiziert. Der Transfer der Proteine aus dem Gel der zweiten Dimension auf die Nitrocellulose-Membran war aufgrund der Dicke des Gels nicht quantitativ, aber für den Western-Blot und die Ponceau S-Färbung bei weitem ausreichend. Anhand der Ponceau S-Färbung konnte das Signal im Western-Blot einer Bande im Coomassie-Gel zugeordnet werden.

Im Western-Blot mit dem PP1 $\gamma$ -Antikörper wurden drei nahe aneinander liegende Banden detektiert: eine intensive Bande (68 kDa) und zwei schwächere Banden (60 kDa, 65 kDa; Abb. 20, A). Im Gel waren diese drei Banden mit kolloidalem Coomassie anfärbbar. In derselben Bahn war eine weitere Bande zu erkennen (Abb. 20, B). Aufgrund der nativen Bedingungen in der ersten Dimension kommt dieses Protein als Bindungspartner des 68 kDa-Proteins im 230 – 270 kDa-Komplex in Frage. Die Größe dieses potentiellen Bindungs-

partners wurde mit 89 kDa bestimmt. Im Gel der zweiten Dimension lagen diese vier Proteine isoliert von anderen Proteinen und in ausreichender Menge vor, so daß sie durch Ansequenzierung identifiziert werden konnten (5.9).



## 5.9 Identifizierung der isolierten Proteine

Die zweidimensionale Gelelektrophorese ermöglichte die Isolierung von vier Proteinen (60 kDa, 65 kDa, 68 kDa, 89 kDa), von denen drei durch Ansequenzierung (Dr. Roland Kellner, Merck, Darmstadt) identifiziert wurden.

Nach zweidimensionaler Gelelektrophorese erfolgte der Transfer auf eine PVDF-Membran. Das 68 kDa-Protein konnte aufgrund einer N-terminalen Blockierung nicht durch Edman-Abbau sequenziert werden. Daraufhin wurde es aus dem Gel ausgeschnitten, mit Proteasen verdaut und die eluierten Peptide mittels Massenspektrometrie (MALDI-MS) und Edman-Abbau sequenziert. Das 60 kDa- und das 89 kDa-Protein wurden ebenfalls nach Verdau ansequenziert. Die Datenbankrecherche mit den ermittelten Aminosäuresequenzen ergab, daß es sich bei diesen Proteinen um CRMP-Isoformen (Collapsin response mediator protein) handelt.

Das 68 kDa-Protein wurde als CRMP-2 identifiziert. Der Identifizierung liegt die Aminosäuresequenz von 11 Peptiden mit insgesamt 278 Aminosäuren (48,6 % des gesamten Proteins) zugrunde (Abb. 21).

Bei dem 60 kDa-Protein handelt es sich ebenfalls um CRMP-2. Hier bildet die Aminosäuresequenz von 10 Peptiden mit insgesamt 196 Aminosäuren (34,3 % des gesamten Proteins) die Grundlage (nicht abgebildet).

Die vom 89 kDa-Protein erhaltenen Aminosäuresequenzen (5 Peptide mit insgesamt 72 Aminosäuren) konnten in den Datenbanken dem menschlichen CRMP-1 zugeordnet werden (Abb. 22). CRMP-1 des Rindes war nicht in den Datenbanken gespeichert. Mit dem 89 kDa-Protein wurde demnach eine weitere, bisher unbekannte CRMP-Isoform im Rind identifiziert. Die vollständige Aminosäuresequenz konnte noch nicht bestimmt werden, sie wird sich aber wahrscheinlich nur geringfügig von der Sequenz des menschlichen CRMP-1 unterscheiden. So weist das menschliche CRMP-1 in seiner Aminosäuresequenz große Übereinstimmung mit seinen Homologen in der Maus und in der Ratte auf (jeweils 96,7 %). Ähnlich verhält es sich mit den Isoformen CRMP-2, -3 und -4. In der einzigen bisher vom Rind bekannten Isoform CRMP-2 sind beispielsweise nur 5 Aminosäuren gegenüber seinem Homologen im Menschen ausgetauscht (Abb. 21). Im Gegensatz dazu unterscheiden sich die CRMP-Isoformen einer

Art in ihrer Aminosäuresequenz deutlich voneinander. So stimmen zum Beispiel die menschlichen Isoformen CRMP-1 und CRMP-2 nur zu 76,2 % in ihrer Aminosäuresequenz überein.

MSYQGKKNIPRITSDRLLIKGGKIVNDDQSFYADIYMEDG	40
LIKQIGENLIVPGGVKTIEAHSRMVIPGGIDVHTRFQMPD	80
QGMTSADDDFFQGTKAALAGGTTMIIDHVPEPGTSLLAFF	120
DQWREWADSKSCCDYSLHVDIT <sup>_____</sup> EW <sup>_____</sup> HKG <sup>_____</sup> VQEEMEALVKDHG	160
VNSFLVYMAFKDRFQLTDS <sup>_____</sup> QIYEVL <sup>_____</sup> SVIRDIGAIAQVHAE	200
NGDIIAEEQQRILDLGITGPEGHVLSRPEEVEAEAVNRS <sup>_____</sup> I	240
TIANQTNCP <sup>_____</sup> LYITKVM <sup>_____</sup> SKS <sup>_____</sup> AAEVIAQARKKGTVVYGEPI <sup>_____</sup> T	280
ASLGTDGSHYWSKNWAKAAAFVTSPP <sup>_____</sup> LS <sup>_____</sup> PDPTTPDFLNSL	320
LSCGDLQVTGSAHCTFNTAQKAVGKDNFTL <sup>_____</sup> LIPEG <sup>_____</sup> TNGTEE	360
RMSVIWDKAVVTGKMDENQFVAVTSTNAAKVFNLYPRKGR	400
IAVGSDADLVIWDPDSVKTISAKTHNSSLEYNIFEGMECR	440
GSPLVVVISQGKIVLEDGTLHVTEGSGRYIPRK <sup>_____</sup> PF <sup>_____</sup> PDFVYK	480
RIKARSRLAELRGVPRGLYDGPVCEVS <sup>_____</sup> VT <sup>_____</sup> PKTVTPASSAK	520
TSPAKQQAPPVRNLHQSGFSLSGAQIDDNI <sup>_____</sup> PRRTTQRIVA	560
PPGGRANITSLG	572

**Abb. 21: Aminosäuresequenz von CRMP-2 des Rindes** (Zugriffsnummer O02675). Die unterstrichenen Sequenzabschnitte wurden mittels Massenspektrometrie (.....) und zusätzlich mittels Edman-Abbau (\_\_\_\_) bestimmt. Die Aminosäuresequenz von CRMP-2 des Menschen (Zugriffsnummer Q16555) unterscheidet sich nur in den grau unterlegten Aminosäuren von der abgebildeten Sequenz.

MSYQGKKSIPHITSDRLLIKGGRIINDDQSLYADVYLEDG	40
LIKQIGENLIVPGGVKTIEANGRMVIPGGIDVNTYLQKPS	80
QGMTAADDFFQGTRAALVGGTTMIIDHVVPEPGSSLLTSF	120
EKWHEAADTKSCCDYSLHVDITSWYDGVREELEVLVQDKG	160
VNSFQVYMAVKDVYQMSDSQLYEAFITFLKGLGAVILVHAE	200
NGDLIAQEQQKRILEMGITGPEGHALSRPEELEAEAVFRAI	240
TIAGRINCPVYITKVMSSAADIIALARKKGPLVFGEPIA	280
ASLGTGTHYWSKNWAKAAAFVTSPLSPDPTTDPDYLTSL	320
LACGDLQVTGSGHCPYSTAQKAVGKDNFTLIPEGVNGIEE	360
RMTVVWDKAVATGKMDENQFVAVTSTNAAKIFNLYPRKGR	400
IAVGSDADVVIWDPDKLKTITAKSHKSAVEYNI FEGMECH	440
GSPLVVISQGKIVFEDGNINVNKGMRFI PRKAFPEHLYQ	480
RVKIRNKVFGLQGVSRGMYDGPVYEVPATPKYATPAPSAK	520
SSPSKHQPPPIRNLHQSNFSLSGAQIDDNNPRRTGHRIVA	560
PPGGRSNI TSLG	572

**Abb. 22: Aminosäuresequenz von CRMP-1 des Menschen** (Zugriffsnummer Q14194). Die unterstrichenen Sequenzabschnitte wurden mittels Massenspektrometrie (-----), Edman-Abbau (.....) oder beider Verfahren (\_\_\_\_\_) bestimmt.

Die Größe von CRMP-2 schließt eine Bindung von PP1 $\gamma$  an dieses Protein unter den Bedingungen der denaturierenden Elektrophorese aus. Desweiteren enthält CRMP-2 nicht die R/K-V/I-x-F-Domäne, die in den meisten PP1-bindenden Proteinen vorkommt. Damit handelt es sich um eine unspezifische Detektion von CRMP-2 durch den PP1 $\gamma$ -Antikörper. Das unterschiedliche Laufverhalten könnte auf einer Phosphorylierung beruhen. Gu et al. (2000) konnten zeigen, daß phosphoryliertes CRMP-2 im denaturierenden Gel als 66 kDa-Bande läuft. Die wesentlich größere Intensität der 68 kDa- gegenüber der 60 kDa-Bande würde demnach dafür sprechen, daß CRMP-2 in der Retina des Rindes vor allem in phosphorylierter Form vorliegt.

Das berechnete Molekulargewicht von CRMP-1 (62 kDa) unterscheidet sich deutlich vom Laufverhalten im denaturierenden Gel. Auch wenn CRMP-1 wahrscheinlich als

Phosphoprotein vorliegt, kann eine Phosphorylierung alleine einen Gelshift von rund 30 kDa nicht erklären. Glykosylierung als eine mögliche posttranslationale Modifizierung wurde untersucht (5.10).

Desweiteren fällt auf, daß CRMP-1 im Gegensatz zu CRMP-2 nach zweidimensionaler Auftrennung nicht vom PP1 $\gamma$ -Antikörper detektiert wird. Nach eindimensionaler Auftrennung in einem denaturierenden Gel scheinen jedoch beide Isoformen vom PP1 $\gamma$ -Antikörper erkannt zu werden (Abb. 17, A).

### **5.10 Untersuchung der Modifikation von CRMP-1**

CRMP-1 und CRMP-2 zeigen trotz nahezu identischen Molekulargewichts im Gel der zweiten Dimension ein unterschiedliches Laufverhalten. Glykosylierung von CRMP-1 könnte dieses Laufverhalten erklären. Diese Möglichkeit wurde durch immunologischen Nachweis von Zuckerresten untersucht.

Die zweidimensional aufgetrennten Proteine wurden auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert. Durch Inkubation mit Periodat-Lösung werden Zucker oxidiert, so daß Digoxigenin über eine Hydrazid-Gruppe an Glykoproteine binden kann. Detektion erfolgt anschließend mit Hilfe Digoxigenin-spezifischer Antikörper. Transferrin (2  $\mu$ g) diene als Positiv- und BSA (2  $\mu$ g) als Negativkontrolle.

Im Gegensatz zu Transferrin wurde CRMP-1 wie auch BSA nicht detektiert. Demnach ist CRMP-1 nicht glykosyliert. Das ungewöhnliche Laufverhalten muß auf eine andere Modifizierung zurückzuführen sein.



## 6 Diskussion

Es wird allgemein angenommen, daß die katalytische Untereinheit der PP1 *in vivo* kaum frei vorkommt (Sim und Scott, 1999), sondern meist in Abhängigkeit ihrer Funktion im jeweiligen Gewebe an unterschiedliche Lokalisationsuntereinheiten gebunden ist. So wird die PP1 über die G<sub>M</sub>-Untereinheit am Glykogen und am sarkoplasmatischen Retikulum der Skelettmuskulatur (Strålfors et al., 1985; Hubbard et al., 1990) und über die G<sub>L</sub>-Untereinheit am Glykogen der Leber (Doherty et al., 1995) verankert. Die M-Untereinheit der glatten und quergestreiften Muskulatur lokalisiert die PP1 an Myofibrillen (Alessi et al., 1992; Dent et al., 1992) und Yotiao vermittelt im Zentralnervensystem die Bindung zwischen der PP1 und dem NMDA-Rezeptor (Westphal et al., 1999).

Die PP1 in der Retina und ihre dort assoziierten Proteine waren Gegenstand dieser Arbeit. Nach Identifizierung der PP1 $\gamma$ 1 in der Retina konnte gezeigt werden, daß diese Isoform der PP1 Bestandteil eines hochmolekularen Komplexes ist. Verschiedene Ansätze zur Aufreinigung eines PP1-Komplexes der Retina scheiterten bereits in der Vergangenheit an seiner Instabilität (Anton, 1996). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte dieses Problem methodisch gelöst werden, indem es möglich war, die PP1 $\gamma$ 1 fluoreszenz- und elektronenmikroskopisch in der Retina zu lokalisieren und somit einen Hinweis auf den subzellulären Verankerungsort der PP1 $\gamma$ 1 zu erhalten.

Desweiteren wurde eine zweidimensionale Gelelektrophorese entwickelt, die die Reinigung eines Proteinkomplexes ermöglichte.

### 6.1 Nachweis der PP1 $\gamma$ 1 in der Retina

Die PP1 $\gamma$ 1 konnte im Western-Blot mit isoform-spezifischen Antikörpern in der Retina des Rindes nachgewiesen werden.

In der Retina ist die Protein-Phosphatase Typ 1 im Gegensatz zu anderen Geweben bisher kaum untersucht. Nur wenige Arbeiten geben Hinweise auf die PP1 in der Retina. Anhand von Aktivitätsmessungen der PP1 gegenüber phosphorylierter Glykogen-Phosphorylase und

mit Hilfe von spezifischen Inhibitoren konnte gezeigt werden, daß die PP1 in der Retina exprimiert wird (Fowles und Akhtar, 1989; Anton 1996). Die Expression einer bestimmten Isoform wurde noch nicht nachgewiesen, lediglich die mRNA der Isoformen PP1 $\alpha$ , PP1 $\gamma$ 1 und PP1 $\gamma$ 2 konnte in der Rinderretina detektiert werden (Anton, 1996; Kutuzov et al., 1998). Wenn man die ontogenetische Abstammung der Retina vom Zentralnervensystem bedenkt, werden neben der PP1 $\gamma$ 1 vermutlich auch die anderen Isoformen der PP1 in der Retina exprimiert. So wurde die Expression der PP1 $\alpha$ , PP1 $\beta$  und PP1 $\gamma$ 1 im Gehirn von Säugetieren nachgewiesen (da Cruz e Silva et al., 1995). Nachdem die PP1 $\gamma$ 2 anfangs als Testes-spezifisch galt (Chun et al., 1994), wurde auch diese Isoform im Gehirn detektiert (Strack et al., 1999).

## 6.2 Die PP1 $\gamma$ 1 als hochmolekularer Komplex in der Retina

Nach dem Nachweis der PP1 $\gamma$ 1 in der Retina stellte sich die Frage nach ihrer Lokalisationsuntereinheit.

Nach Dialyse des Schüttelüberstandes eluierte ein Großteil der PP1 $\gamma$ 1 bei etwa 54 kDa, nur ein geringer Anteil im hochmolekularen Bereich. Die säulenchromatographische Aufreinigung eines PP1-Komplexes aus der Retina scheiterte in der Vergangenheit an dessen Instabilität (Anton, 1996). Daher wurde zur Identifizierung des PP1 $\gamma$ 1-Komplexes ein anderer Ansatz gewählt. Dieser bestand in der Lokalisierung der PP1 $\gamma$ 1 in der Retina und Präparation der entsprechenden subzellulären Bereiche.

Ein erster Hinweis auf ihre Lokalisierung ergab sich aus der Gewinnung des Schüttelüberstandes. Die Extraktion der PP1 $\gamma$ 1 aus der Retina erfolgte nach Schnetkamp und Daemen (1982). Die isolierten Retinae wurden in den Extraktionspuffer gegeben und kurz geschüttelt. Dadurch brechen die Photorezeptorzellen – zwischen Stäbchen und Zapfen wird in dieser Präparation nicht unterschieden – am Verbindungscilium und teilweise oberhalb des Perikaryons auf. Die übrigen Zellen der Retina bleiben weitestgehend intakt und wurden im Gewebeverband abzentrifugiert. Diese Verfahrensweise machte eine Lokalisierung der im Überstand vorkommenden PP1 $\gamma$ 1 in den Photorezeptorzellen wahrscheinlich. Diese

Vermutung konnte immunhistochemisch am Fluoreszenzmikroskop bestätigt werden. Doppelmarkierung mit Centrin ermöglichte weiterhin die Lokalisierung der PP1 $\gamma$ 1 im Verbindungscilium und am sogenannten Basalkörperkomplex.

Die Lokalisierung einer PP1-Isoform in einem nicht-motilen Verbindungscilium wurde bisher noch nicht beschrieben. Lediglich in den motilen Cilien von *Paramecium* (Friderich et al., 1992; Momayezi et al., 1996) und im Flagellum von *Chlamydomonas* (Yang et al., 2000) wurde die PP1 schon identifiziert. Auch die Lokalisierung der PP1 $\gamma$ 1-Isoform am Basalkörper der Photorezeptorzelle wurde zuvor noch nicht gezeigt. PP1 $\alpha$  wurde immunhistochemisch während der Mitose und in der Interphase an Centrosomen lokalisiert (Andreassen et al., 1998). Desweiteren konnten mit AKAP350/Yotiao (Schmidt et al., 1999) und AKAP450/CG-NAP (Takahashi et al., 1999) bereits zwei Untereinheiten identifiziert werden, die die PP1 am Centrosom verankern.

Im neuronalen Gewebe – zu dem auch die Retina gehört – wurde die PP1 hauptsächlich in der partikulären Fraktion gefunden (Sim et al., 1994). Die lösliche PP1 ist an spezifische Inhibitoren wie zum Beispiel DARPP-32 und Inhibitor-1 gebunden (Hemmings et al., 1992). Die PP1 $\gamma$ 1 wurde in der vorliegenden Arbeit als ein Bestandteil der Cytoskelettfraktion des Cilienapparates identifiziert und gehört somit auch im neuronalen Gewebe der Retina zur partikulären Fraktion. Die Detektion der PP1 $\gamma$ 1 in der Präparation der Außensegmente kann auch auf die Assoziation mit dem Cilienapparat zurückgeführt werden. Die in der Vergangenheit detektierte PP1-Aktivität in Außensegment-Präparationen könnte somit auf der mit dem Cilienapparat assoziierten PP1 $\gamma$ 1 beruhen (Fowles und Akhtar, 1989).

Die Cytoskelettfraktion des Cilienapparates umfaßt alle Verbindungen, die sich nach der unter 4.2.3 beschriebenen Präparation im Niederschlag befinden. Dazu gehört der Basalkörperkomplex im apikalen Bereich des Innensegments, von dem Mikrotubuli in das Innensegment und als Axonem durch das Verbindungscilium in das Außensegment reichen (Pagh-Roehl und Burnside, 1995). Im Verbindungscilium sind die Mikrotubuli-Paare über zum Axonem senkrecht verlaufende Y-förmige Strukturen in der Membran so fest verankert (Horst et al., 1987), daß auch Membranproteine, zum Beispiel die Guanylatcyclase,

mitpräpariert werden (Fleischman et al., 1980). Desweiteren gehören Centrin (Wolfrum, 1995) und Actin (Wolfrum und Schmitt, 1999 und 2000; Liu et al., 1999; Chaitin et al., 1984; Arikawa und Williams, 1989) zum Cilienapparat. Daneben werden noch Motorproteine der Mikrotubuli (Kinesin-verwandte Proteine; Muresan et al., 1997) und der Actinfilamente (Myosin VIIa; Wolfrum et al., 1998) durch diese Präparation erfaßt. Actinfilamente des Innensegments werden nicht präpariert (Pagh-Roehl und Burnside, 1995).

An welchen Bestandteil des Cilienapparates im Bereich des Verbindungsciliums die PP1 $\gamma$ 1 gebunden ist, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden. Die Schwierigkeit besteht prinzipiell darin, daß die PP1 über ihre Untereinheiten verankert wird. Sequenzmotive, die einen Rückschluß auf den Verankerungsort ermöglichen, trägt dementsprechend die Untereinheit und nicht die PP1. Ein Vergleich mit der PP1 im Gehirn gibt jedoch einen Hinweis auf einen wahrscheinlichen Verankerungsort der PP1 $\gamma$ 1 im Verbindungscilium: An Gehirnpräparationen wurde gezeigt, daß die Assoziation der PP1 mit den Komponenten des Cytoskeletts isoform-spezifisch ist. So findet sich die PP1 $\beta$  in Mikrotubuli-Präparationen, die PP1 $\gamma$ 1 hingegen am Actin-Cytoskelett (Strack et al., 1999). Interessant ist in diesem Zusammenhang der Befund, daß in der vorliegenden Arbeit ein von der Gelfiltrationssäule mit der PP1 $\gamma$ 1 co-eluierendes Protein als Actin identifiziert wurde. Die Bindung von PP1 $\gamma$ 1 an Actin könnte ihr Auftreten in den hochmolekularen Fraktionen erklären. Weiterhin spricht die elektronenmikroskopische Lokalisierung der PP1 $\gamma$ 1 im Verbindungscilium zwischen Axonem und Zellmembran und an der Basis des Außensegments für eine Interaktion mit Actin. Actinfilamente wurden an der Basis des Außensegments detektiert (Chaitin et al., 1984; Arikawa und Williams, 1989). Erst vor kurzem gelang der Nachweis von Actin entlang der gesamten cytoplasmatischen Seite der Membran des Verbindungsciliums (Wolfrum und Schmitt, 1999 und 2000). Desweiteren wurden im Gehirn mit Neurabin I und Neurabin II/Spinophilin zwei Proteine identifiziert, die F-Actin- und PP1-bindende Eigenschaften aufweisen (Allen et al., 1997; MacMillan et al., 1999; Nakanishi et al., 1997; Satoh et al., 1998) und somit als Lokalisationsuntereinheit der PP1 in Frage kommen. Dabei scheint die Bindung der PP1 isoform-spezifisch zu sein:

Immunpräzipitation von Neurabin I und Neurabin II fällt auch die PP1 $\gamma$ 1, nicht jedoch die PP1 $\beta$  (MacMillan et al., 1999). Neurabin I und Neurabin II sind in sogenannten „postsynaptic densities“, actin-haltigen Strukturen an der cytoplasmatischen Seite exzitatorischer Synapsen, angereichert. Spinophilin war das erste PP1-bindende Protein überhaupt, das im Gehirn gefunden wurde und das Vorkommen der PP1 in partikulären Fraktionen erklärt (Allen et al., 1997).

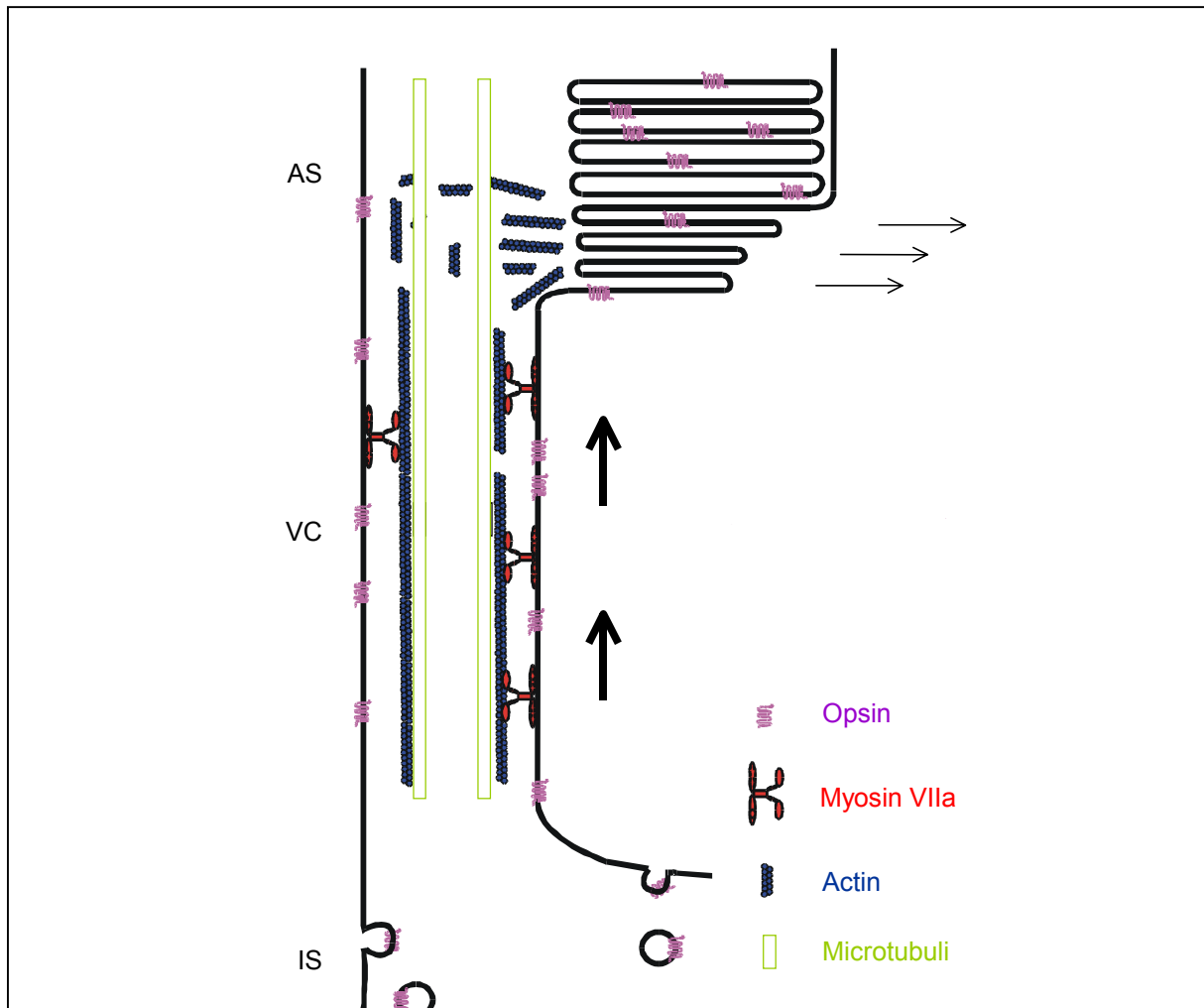
Während die Assoziation der PP1 $\gamma$ 1 mit Actinfilamenten ihr Auftreten in hochmolekularen Fraktionen der Gelfiltration erklären könnte, ist nicht auszuschließen, daß die PP1 $\gamma$ 1 der 54 kDa-Fraktion auf einen Zerfall dieses hochmolekularen Komplexes zurückzuführen ist. Andererseits könnte das Auftreten der PP1 $\gamma$ 1 in der 54 kDa-Fraktion für einen weiteren Komplex der PP1 $\gamma$ 1 im Verbindungscilium und in den angrenzenden Bereichen des Innen- und Außensegments sprechen.

Im Gegensatz zum Actin wird Centrin innerhalb der Mikrotubuli-Dubletts des Axonems vermutet (Wolfrum, 1998) und käme daher als Bindungspartner der PP1 $\gamma$ 1 im Verbindungscilium nicht in Frage. Eine Interaktion zwischen Centrin und der PP1 $\gamma$ 1 im Basalkörperkomplex kann aufgrund der vorliegenden Daten jedoch nicht ausgeschlossen werden.

### **6.3 Funktion der PP1 in der Retina**

Die Lokalisierung der PP1 im Bereich des Verbindungsciliums, die Assoziation mit dem Cilienapparat und schließlich die Co-Elution von Actin und PP1 $\gamma$ 1 in hochmolekularen Fraktionen der Gelfiltration lassen eine Regulation Actin-vermittelter Vorgänge in der Photorezeptorzelle durch die PP1 $\gamma$ 1 vermuten. Gestützt wird diese Hypothese durch die Detektion der PP1 $\gamma$ 1 in Präparationen des Actin-Cytoskeletts (Strack et al., 1999) und Assoziation dieser Isoform mit den F-Actin-bindenden Neurabinen (Allen et al., 1997; MacMillan et al., 1999) im Gehirn. In den Photorezeptorzellen der Retina wird Actinfilamenten eine Beteiligung an zwei bedeutenden Funktionen des Verbindungsciliums

zugeschrieben: dem aktiven Transport cytosolischer und membrangebundener Proteine und der Bildung der flachen Membransäckchen (Disks) an der Basis des Außensegments.



**Abb. 23: Schematische Darstellung einer Photorezeptorzelle im Bereich des Verbindungsciliums.** Die PP1 $\gamma$ 1 wurde an der Basis des Außensegments und im Verbindungscilium zwischen den ringförmig angeordneten Mikrotubuli-Paaren des Axonems und der Zellmembran detektiert. Diese Lokalisierung läßt eine Interaktion der PP1 $\gamma$ 1 mit Actin in diesen Bereichen und somit eine Beteiligung an Transportvorgängen (dicke Pfeile) und der Bildung der Disks (dünne Pfeile) vermuten. IS: Innensegment, VC: Verbindungscilium, AS: Außensegment  
Die Abbildung ist aus Wolfrum und Schmitt (1999) entnommen.

Das Verbindungscilium ist ein nicht-motiles Cilium. Es verbindet das Innensegment mit dem Außensegment und spielt aufgrund dieser Lage eine wichtige Rolle in Ausbildung und Erhalt des polaren Aufbaus der Photorezeptorzelle. So werden die cytosolischen und membrangebundenen Komponenten für die photo-elektrische Transduktion im Innensegment synthetisiert und müssen vom Syntheseort in den apikalen Bereich des Innensegments und von dort durch das Verbindungscilium in das Außensegment transportiert werden. Weiterhin scheint der Transport durch das Verbindungscilium genau reguliert zu sein: Während die  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase nur im Innensegment vorkommt und Opsin auf das Außensegment begrenzt ist, ist die Verteilung der  $\alpha$ -Untereinheit des Transducins und des Arrestins zwischen Innensegment und Außensegment abhängig von der Lichteinwirkung. Aufgrund der Anreicherung in einem der beiden Segmente ist ein aktiver Transport anzunehmen (zusammengefaßt in: Besharse und Horst, 1990). Es wird vermutet, daß die Rückdiffusion zum Teil durch Y-förmige Strukturen eingeschränkt wird. Diese Strukturen sind an Mikrotubuli-Dubletts des Axonems gebunden und fest in der Membran des Verbindungsciliums verankert (Horst et al., 1987).

Der aktive Transport durch das Verbindungscilium ist einerseits über das Kinesin-Mikrotubuli-System des Axonems, andererseits über das Myosin-Actin-System denkbar. Mitglieder der Kinesin-Superfamilie wurden am Cilienapparat identifiziert (Muresan et al., 1997). *In vitro* wurde eine Assoziation eines Kinesin-verwandten Proteins aus *Drosophila* mit der PP1 nachgewiesen (Alphey et al., 1997). Actin konnte erst vor kurzem im Verbindungscilium nachgewiesen werden. Actinfilamente verlaufen hier wahrscheinlich unterhalb der Zellmembran entlang des gesamten Verbindungsciliums (Wolfrum und Schmitt, 1999 und 2000; Liu et al., 1999). Als mögliches Motorprotein wurde in diesem Bereich Myosin VIIa detektiert (Liu et al., 1997). Myosin VIIa ist ein unkonventionelles Myosin. Es wird angenommen, daß es sich über seine Actin-bindende Motordomäne am Actinfilament entlangbewegt und dabei an die Schwanzdomäne gebundene Membranbereiche des Verbindungsciliums einschließlich membrangebundener Proteine (zum Beispiel Opsin) vom apikalen Bereich des Innensegments an die Basis des Außensegments transportiert (Wolfrum und Schmitt, 1999 und 2000; Liu et al., 1999). An diesem Transportsystem in der

Photorezeptorzelle könnte die PP1 $\gamma$ 1 in Analogie zur PP1 $\beta$  in der glatten und quergestreiften Muskulatur (Alessi et al., 1992; Dent et al., 1992) beteiligt sein.

Die Disks werden kontinuierlich an der Basis des Außensegments durch Ausstülpung der Membran des Verbindungsciliums gebildet und an der Spitze der Außensegmente von den Zellen des Pigmentepithels phagozytiert (Steinberg et al., 1980). Actinfilamente verlaufen an der Basis der Außensegmente senkrecht zum Axonem, eine Quervernetzung über  $\alpha$ -Actinin wird angenommen (Chaitin et al., 1984; Arikawa und Williams, 1989). Zusammen mit dem konventionellen Myosin II wird den Actinfilamenten eine Rolle bei der Diskbildung zugeschrieben (Chaitin und Coelho, 1992; Williams et al., 1992). In diesem Fall könnte die PP1 $\gamma$ 1 über die Regulation eines Actin-Myosin-Systems an Membranausstülpung und -fusion beteiligt sein. Ein hochmolekularer Komplex der PP1 erwies sich als essentiell für Membranfusionen (Peters et al., 1999).

## 6.4 Aufreinigung von CRMP-1 und CRMP-2 aus der Retina

Der Schüttelüberstand wurde im Batch-Verfahren aufgereinigt und nach Konzentrierung auf eine Gelfiltrationssäule gegeben. Die 230 – 270 kDa Fraktion wurde anschließend in einer zweidimensionalen Gelelektrophorese weiter aufgetrennt. Die Kombination von nativer und denaturierender Gelelektrophorese ermöglichte hierbei nicht nur die Reinigung von CRMP-1 und CRMP-2 (Collapsin response mediator protein) aus der Retina, sondern erbrachte auch den Nachweis, daß sie Teil eines 230 – 270 kDa-Komplexes sind.

CRMPs gehören zu einer Familie cytosolischer Phosphoproteine, die bislang ausschließlich im zentralen und peripheren Nervensystem gefunden wurden. Zu den Mitgliedern dieser Familie gehören unter anderem CRMP-1 – 4, CRMP-62, Ulip 1 – 4 (Unc-33-like phosphoprotein), DRP 1 – 3 (Dihydropyrimidinase-Related Protein) und TOAD-64 (Turned On After Division). Als einheitliche Familienbezeichnung wurde TUC (TOAD/Ulip/CRMP) vorgeschlagen (Quinn et al., 1999).



Auffallend war einerseits das unterschiedliche Laufverhalten von CRMP-1 und CRMP-2 trotz identischen, berechneten Molekulargewichts von 62 kDa und andererseits der große Intensitätsunterschied nach Anfärbung mit kolloidalem Coomassie. Diese Beobachtungen lassen sich sehr gut in das bestehende Bild über CRMPs und ihre Proteinfamilie einfügen und zeigen die Aussagekraft der verwendeten zweidimensionalen Gelelektrophorese:

- Aus dem Gehirn des Rindes isoliertes CRMP eluierte von einer Gelfiltrationssäule als Tetramer (250 kDa). An CRMP-Isoformen der Ratte konnte gezeigt werden, daß bevorzugt Hetero-Oligomerisation begünstigt ist (Wang und Strittmatter, 1997). In der Retina des Rindes könnte es sich demnach um ein Heterotetramer bestehend aus CRMP-1 und CRMP-2 handeln.
- Das Auftreten von CRMP-2 als 68 kDa-Bande könnte auf eine Phosphorylierung zurückzuführen sein. So konnte gezeigt werden, daß phosphoryliertes CRMP-2 als 66 kDa-Bande, unphosphoryliertes CRMP-2 hingegen als 62 kDa-Bande auftritt (Gu et al., 2000). Demnach würde das CRMP-2 in der Retina des Rindes aufgrund des Intensitätsunterschieds – die 68 kDa-Bande ist nach Coomassie-Färbung wesentlich intensiver als die 62 kDa-Bande – vor allem in phosphorylierter Form vorliegen.
- CRMP-1 zeigte als 89 kDa-Bande die größte Abweichung vom berechneten Molekulargewicht. Phosphorylierung ist auch hier nicht auszuschließen, eine Glykosylierung konnte nicht nachgewiesen werden.
- Gleiche Anfärbbarkeit mit Coomassie vorausgesetzt, kommt CRMP-2 in der Retina des Rindes wesentlich häufiger vor als CRMP-1. Diese Beobachtung bestätigt das Expressionsmuster der CRMP-Isoformen im Nervensystem. Die Expression von CRMP-2 übersteigt demnach die von CRMP-1 im adulten Nervensystem der Ratte (Wang und Strittmatter, 1996).

Antikörper gegen eine der Isoformen von CRMP standen nicht zur Verfügung. Eine immunhistochemische Lokalisierung in der Retina war daher nicht möglich. Da diese Isoformen aus dem Schüttelüberstand gereinigt wurden, ist jedoch nicht auszuschließen, daß sie wie die PP1 $\gamma$ 1 in der Photorezeptorzelle exprimiert werden.

Die Funktion der CRMPs ist erst wenig erforscht. Von CRMP-62 wurde eine Beteiligung am sogenannten Wachstumskegelkollaps nachgewiesen (Goshima et al., 1995). Es gilt jedoch als wahrscheinlich, daß die Mitglieder der TUC-Familie noch weitere Funktionen besitzen. So wurde im Gehirn der Maus nur ein kleiner Teil an CRMP-2 im Wachstumskegel lokalisiert, während es größtenteils im Axon, in den Dendriten und im Zellkörper vorkommt (Kamata et al., 1998). Eine Beteiligung an Stabilisierung und Umbau des Cytoskeletts wird diskutiert (Kamata et al., 1998; Gu und Ihara, 2000). So besitzen CRMPs eine basische Domäne, die die Bindung an Mikrotubuli vermitteln könnte. Phosphorylierung des benachbarten C-Terminus (Gu et al., 2000) wird als möglicher Regulationsmechanismus dieser Bindung diskutiert. CRMP-2 wurde als Substrat der Rho-Kinase identifiziert (Arimura et al., 2000), Phosphatasen sind bisher nicht bekannt. Desweiteren wird eine mögliche Funktion der CRMP-Heterotetramere als Quervernetzer von Mikrotubuli erwähnt (Gu und Ihara, 2000).

## 6.5 Ausblick

Die Identifizierung der PP1 $\gamma$ 1 als Bestandteil des Cilienapparates der Photorezeptorzelle der Retina und die Reinigung von CRMP-1 und CRMP-2 einerseits, die Etablierung der Immunpräzipitation und der zweidimensionalen Gelelektrophorese andererseits eröffnen ein breites Spektrum von Forschungsansätzen.

Von besonders großem Interesse ist die Identifizierung der Lokalisationsuntereinheiten. Über sie kann der genaue Verankerungsort der PP1 $\gamma$ 1 ermittelt werden und sind Rückschlüsse auf das physiologische Substrat möglich. Die Lokalisationsuntereinheiten könnten zum Beispiel nach denaturierender Auftrennung der Cytoskelettfraktion des Cilienapparates und anschließendem Transfer auf eine Membran mit Digoxigenin-gekoppelter PP1 detektiert werden (Far-Western-Blot).

Hemmstoffe der PP1 stehen zur Verfügung, um das physiologische Substrat in der Retina zu identifizieren. In Analogie zur Funktion der PP1 in der Muskulatur sind die im Bereich des Verbindungsciliums lokalisierten Motorproteine Myosin II und Myosin VIIa (Chaitin und Coelho, 1992; Williams et al., 1992; Liu et al., 1997) sicherlich aussichtsreiche Kandidaten.

Im Falle einer immunhistochemisch nachzuweisenden Lokalisierung im Verbindungscilium ist auch CRMP-2 ein potentielles Substrat der PP1 $\gamma$ 1. Die Rho-Kinase könnte zur Phosphorylierung von CRMP-2 herangezogen werden. Bei der Suche nach Substraten der PP1 ist prinzipiell zu bedenken, daß sich die Substratspezifität der gebundenen PP1 durchaus von der der freien katalytischen Untereinheit unterscheiden kann. Aktivitätsmessungen in Gegenwart der Untereinheit wären hier ein Ansatz.

In einem nächsten Schritt könnte die Funktion der PP1 experimentell durch Co-Expression mit dem physiologischen Substrat und/oder der Lokalisationsuntereinheit in verschiedenen Zellsystemen ermittelt werden.

Die Lokalisierung der PP1 $\gamma$ 1 im Verbindungscilium der Photorezeptorzelle der Retina läßt die Frage aufkommen, ob sie generell – mit unterschiedlichen Funktionen – in ciliären Strukturen anderer Sinnesorgane wie den Cilien der Haarsinneszellen im Innenohr und im Riechepithel vorkommt. Eine derartige Verteilung konnte zum Beispiel von Myosin VIIa nachgewiesen werden (Wolfrum et al., 1998).

Zuletzt werden die im Rahmen der vorliegenden Arbeit etablierten Techniken der Immunpräzipitation und der zweidimensionalen Gelelektrophorese in naher Zukunft sicherlich einen wertvollen Beitrag zur Aufklärung weiterer Proteinkomplexe leisten können.

## 7 Zusammenfassung

Die PP1 ist in Abhängigkeit ihrer Funktion im jeweiligen Gewebe an unterschiedliche regulatorische Untereinheiten gebunden. In der Retina gibt es bisher nur wenige Hinweise auf das Vorliegen von PP1-Komplexen. Die Identifizierung eines solchen Komplexes über eine säulenchromatographische Reinigung scheiterte an seiner Instabilität (Anton, 1996). Dieses Problem konnte in der vorliegenden Arbeit methodisch gelöst werden, indem die subzelluläre Lokalisierung der PP1 in der Retina die gezielte Präparation eines PP1-Komplexes ermöglichte.

Im Western-Blot konnte mit Hilfe Isoform-spezifischer Antikörper die PP1 $\gamma$ 1 im Schüttelüberstand der Retina nachgewiesen werden. Fluoreszenzmikroskopisch wurde die PP1 $\gamma$ 1 im Bereich der Photorezeptorzelle detektiert. Doppelmarkierung mit Centrin grenzte diesen Bereich weiter ein und lokalisierte die PP1 $\gamma$ 1 im Verbindungscilium und am Basalkörperkomplex. Elektronenmikroskopisch wurde diese Lokalisierung bestätigt und konnte die PP1 $\gamma$ 1 subciliär zwischen Axonem und Membran des Verbindungsciliums und an der Basis des Außensegments detektiert werden. Weiterhin konnte gezeigt werden, daß die PP1 $\gamma$ 1 in diesem Bereich der Photorezeptorzelle partikulär vorliegt und ein Bestandteil des Cilienapparates ist.

An welchen Bestandteil des Cilienapparates die PP1 $\gamma$ 1 gebunden ist, konnte mit den vorhandenen Methoden nicht geklärt werden. Die elektronenmikroskopische Lokalisierung und die Identifizierung eines mit der PP1 $\gamma$ 1 von der Gelfiltrationssäule co-eluierenden Proteins als Actin sprechen jedoch für eine Interaktion mit Mikrofilamenten. Zusammenfassend lassen die Ergebnisse eine Beteiligung der PP1 $\gamma$ 1 an Transportvorgängen und an der Diskbildung im Bereich des Verbindungsciliums vermuten.

Immunpräzipitation und zweidimensionale Gelelektrophorese bestehend aus nativer (1. Dimension) und denaturierender Elektrophorese (2. Dimension) wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit etabliert. Die zweidimensionale Gelelektrophorese ermöglichte die Isolierung von CRMP-1 und CRMP-2 und wies sie als Bestandteile eines 230 – 270 kDa großen Komplexes nach.

## 8 Literaturverzeichnis

- Aggen, J.B., Nairn, A.C., Chamberlin, R. (2000): Regulation of protein phosphatase-1. *Chemistry & Biology* **7**, R13-R23.
- Alessi, D., MacDougall, L.K., Sola, M.M., Ikebe, M., Cohen, P. (1992): The control of protein phosphatase-1 by targetting subunits. The major myosin phosphatase in avian smooth muscle is a novel form of protein phosphatase-1. *Eur. J. Biochem.* **210**, 1023-1035.
- Allen, P.B., Kwon, Y.-G., Nairn, A.C., Greengard, P. (1998): Isolation and characterization of PNUTS, a putative protein phosphatase 1 nuclear targeting subunit. *The Journal of Biological Chemistry* **273**, 4089-4095.
- Allen, P.B., Ouimet, C.C., Greengard, P. (1997): Spinophilin, a novel protein phosphatase 1 binding protein localized to dendritic spines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 9956-9961.
- Alphey, L., Parker, L., Hawcroft, G., Guo, Y., Kaiser, K., Morgan, G. (1997): KLP38B: A mitotic kinesin-related protein that binds PP1. *The Journal of Cell Biology* **2**, 395-409.
- Andreassen, P.R., Lacroix, F.B., Villa-Moruzzi, E., Margolis, R.L. (1998): Differential subcellular localization of protein phosphatase-1  $\alpha$ ,  $\gamma$ 1, and  $\delta$  isoforms during both interphase and mitosis in mammalian cells. *The Journal of Cell Biology* **5**, 1207-1215.
- Anton, H. (1996): Proteinphosphatase Typ 1 aus der Rinderretina – Reinigung, Charakterisierung und Expression. Dissertation der Fakultät für Chemie und Pharmazie der Universität Tübingen.
- Arikawa, K., Williams, D.S. (1989): Organization of actin filaments and immunocolocalization of alpha-actinin in the connecting cilium of rat photoreceptors. *The Journal of Comparative Neurology* **288**, 640-646.
- Arimura, N., Inagaki, N., Chihara, K., Ménager, C., Nakamura, N., Amano, M., Iwamatsu, A., Goshima, Y., Kaibuchi, K. (2000): Phosphorylation of collapsin response mediator protein-2 by rho-kinase: Evidence for two separate signaling pathways for growth cone collapse. *The Journal of Biological Chemistry* **275**, 23973-23980.

- Armstrong, C.G., Browne, G.J., Cohen, P., Cohen, P.T.W. (1997): PPP1R6, a novel member of the family of glycogen-targetting subunits of protein phosphatase 1. *FEBS Letters* **418**, 210-214.
- Armstrong, C.G., Doherty, M.J., Cohen, P.T.W. (1998): Identification of the separate domains in the hepatic glycogen-targeting subunit of protein phosphatase 1 that interact with phosphorylase  $\alpha$ , glycogen and protein phosphatase 1. *Biochemical Journal* **336**, 699-704.
- Barford, D. (1999): Structural studies of reversible protein phosphorylation and protein phosphatases. *Biochem. Soc. Trans.* **27**, 751-766.
- Baron, A.T., Greenwood, T.M., Bazinet, C.W., Salisbury, J.L. (1992): Centrin is a component of the pericentriolar lattice. *Biology of the Cell* **76**, 383-388.
- Besharse, J.C., Horst, C.J. (1990): The photoreceptor connecting cilium. A model for the transition zone. In: *Ciliary and Flagellar Membranes*, Bloodgood, R.A. (Herausgeber), Plenum Publishing Corporation, 389-417.
- Beullens, M., Stalmans, W., Bollen, M. (1996): Characterization of a ribosomal inhibitory polypeptide of protein phosphatase-1 from rat liver. *Eur. J. Biochem.* **239**, 183-189.
- Blum, H., Beier, H., Gross, H.J. (1987): Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* **8**, 93-99.
- Bradford, M.M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**, 248-254.
- Chaitin, M.H., Coelho, N. (1992): Immunogold localization of myosin in the photoreceptor cilium. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* **33**, 3103-3108.
- Chaitin, M.H., Schneider, B.G., Hall, M.O., Papermaster, D.S. (1984): Actin in the photoreceptor connecting cilium: Immunocytochemical localization to the site of outer segment disk formation. *The Journal of Cell Biology*, **99**, 239-247.
- Chun, Y.-S., Shima, H., Nagasaki, K., Sugimura, T., Nagao, M. (1994): PP1 $\gamma$ 2, a testis-specific protein-serine/threonine-phosphatase type 1 catalytic subunit, is associated with a protein having high sequence homology with the 78-kDa glucose-regulated protein, a

- member of the 70-kDa heat shock protein family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 3319-3323.
- Cohen, P.T.W. (1994): Nomenclature and chromosomal localization of human protein serine/threonine phosphatase genes. *Adv. Prot. Phosphatases* **8**, 371-376.
- Cohen, P.T.W. (1997): Novel protein serine/threonine phosphatases: variety is the spice of life. *trends in Biochemical Sciences* **22**, 245-250.
- Colledge, M., Scott, J.D. (1999): AKAPs: from structure to function. *trends in Cell Biology* **9**, 216-221.
- da Cruz e Silva, E.F., Fox, C.A., Ouimet, C.C., Gustafson, E., Watson, S.J., Greengard, P. (1995): Differential expression of protein phosphatase 1 isoforms in mammalian brain. *Journal of Neuroscience* **15**, 3375-3389.
- Dent, P., MacDougall, L.K., MacKintosh, C., Campbell, D.G., Cohen, P. (1992): A myofibrillar protein phosphatase from rabbit skeletal muscle contains the  $\beta$  isoform of protein phosphatase-1 complexed to a regulatory subunit which greatly enhances the dephosphorylation of myosin. *Eur. J. Biochem.* **210**, 1037-1044.
- Dinischiotu, A., Beullens, M., Stalmans, W., Bollen, M. (1997): Identification of sds22 as an inhibitory subunit of protein phosphatase-1 in rat liver nuclei. *FEBS Letters* **402**, 141-144.
- Dohadwala, M., da Cruz e Silva, E.F., Hall, F.L., Williams, R.T., Carbonaro-Hall, D.A., Nairn, A.C., Greengard, P., Berndt, N. (1994): Phosphorylation and inactivation of protein phosphatase 1 by cyclin-dependent kinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 6408-6412.
- Doherty, M.J., Moorhead, G., Morrice, N., Cohen, P., Cohen, P.T.W. (1995): Amino acid sequence and expression of the hepatic glycogen-binding ( $G_L$ )-subunit of protein phosphatase-1. *FEBS Letters* **375**, 294-298.
- Doherty, M.J., Young, P.R., Cohen, P.T.W. (1996): Amino acid sequence of a novel protein phosphatase 1 binding protein (R5) which is related to the liver- and muscle-specific glycogen binding subunits of protein phosphatase 1. *FEBS* **399**, 339-343.

- Dowling, J.E., Boycott, B.B. (1966): Organization of the primate retina: electron microscopy. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **166**, 80-111.
- Egloff, M.-P., Johnson, D.F., Moorhead, G., Cohen, P.T.W., Cohen, P., Barford, D. (1997): Structural basis for the recognition of regulatory subunits by the catalytic subunit of protein phosphatase 1. *The EMBO Journal* **8**, 1876-1887.
- Eto, M., Senba, S., Morita, F., Yazawa, M. (1997): Molecular cloning of a novel phosphorylation-dependent inhibitory protein of protein phosphatase-1 (CPI17) in smooth muscle: its specific localization in smooth muscle. *FEBS Letters* **410**, 356-360.
- Fleischman, D., Denisevich, M., Raveed, D., Pannbacker, R.G. (1980): Association of guanylate cyclase with the axoneme of retinal rods. *Biochimica et Biophysica Acta* **630**, 176-186.
- Fowles, C., Akhtar, M., Cohen, P. (1989): Interplay of phosphorylation and dephosphorylation in vision: protein phosphatases of bovine rod outer segments. *Biochemistry* **28**, 9385-9391.
- Friderich, G., Klumpp, S., Russell, C.B., Hinrichsen, R.D., Kellner, R., Schultz, J.E. (1992): Purification, characterization and structure of protein phosphatase 1 from the cilia of paramecium tetraurelia. *Eur. J. Biochem.* **209**, 43-49.
- Gong, M.C., Fuglsang, A., Alessi, D., Kobayashi, S., Cohen, P., Somlyo, A.V., Somlyo, A.P. (1992): Arachidonic acid inhibits myosin light chain phosphatase and sensitizes smooth muscle to calcium. *The Journal of Biological Chemistry* **30**, 21492-21498.
- Gordon, S.E., Brautigan, D.L., Zimmerman, A.L. (1992): Protein phosphatases modulate the apparent agonist affinity of the light-regulated ion channel in retinal rods. *Neuron* **9**, 739-748.
- Goshima, Y., Nakamura, F., Strittmatter, P., Strittmatter, S.M. (1995): Collapsin-induced growth cone collapse mediated by an intracellular protein related to UNC-33. *Nature* **376**, 509-514.
- Greengard, P., Nairn, A.C., Girault, J.-A., Ouimet, C.C., Snyder, G.L., Fisone, G., Allen, P.B., Fienberg, A., Nishi, A. (1998): The DARPP-32/protein phosphatase-1 cascade: a model for signal integration. *Brain Research Reviews* **26**, 274-284.



- Gu, Y., Hamajima, N., Ihara, Y. (2000): Neurofibrillary tangle-associated collapsin response mediator protein-2 (CRMP-2) is highly phosphorylated on Thr-509, Ser-518, and Ser-522. *Biochemistry* **39**, 4267-4275.
- Gu, Y., Ihara, Y. (2000): Evidence that collapsin response mediator protein-2 is involved in the dynamics of microtubules. *The Journal of Biological Chemistry* **275**, 17917-17920.
- Helps, N.R., Barker, H.M., Elledge, S.J., Cohen, P.T.W. (1995): Protein phosphatase 1 interacts with p53BP2, a protein which binds to the tumour suppressor p53. *FEBS Letters* **377**, 295-300.
- Hemmings, H.C., Girault, J.A., Nairn, A.C., Bertuzzi, G., Greengard, P. (1992): Distribution of protein phosphatase inhibitor-1 in brain and peripheral tissues of various species: comparison with DARPP-32. *Journal of Neurochemistry* **59**, 1053-1061.
- Hemmings, H.C., Greengard, P., Tung, H.Y., Cohen, P. (1984): DARPP-32, a dopamine-regulated neuronal phosphoprotein, is a potent inhibitor of protein phosphatase-1. *Nature* **310**, 503-505.
- Hiraga, A., Cohen, P. (1986): Phosphorylation of the glycogen-binding subunit of protein phosphatase-1G by cyclic-AMP-dependent protein kinase promotes translocation of the phosphatase from glycogen to cytosol in rabbit skeletal muscle. *Eur. J. Biochem.* **161**, 763-769.
- Horst, C.J., Forestner, D.M., Besharse, J.C. (1987): Cytoskeletal-membrane interactions: A stable interaction between cell surface glycoconjugates and doublet microtubules of the photoreceptor connecting cilium. *The Journal of Cell Biology* **105**, 2973-2987.
- Hsieh-Wilson, L.C., Allen, P.B., Watanabe, T., Nairn, A.C., Greengard, P. (1999): Characterization of the neuronal targeting protein spinophilin and its interactions with protein phosphatase-1. *Biochemistry* **38**, 4365-4373.
- Huang, X., Honkanen, R.E. (1998): Molecular cloning, expression, and characterization of a novel human serine/threonine protein phosphatase, PP7, that is homologous to *Drosophila* retinal degeneration C gene product (*rdgC*). *The Journal of Biological Chemistry* **273**, 1462-1468.

- Hubbard, M.J., Cohen, P. (1989a): Regulation of protein phosphatase-1<sub>G</sub> from rabbit skeletal muscle. 1. Phosphorylation by cAMP-dependent protein kinase at site 2 releases catalytic subunit from the glycogen-bound holoenzyme. *Eur. J. Biochem.* **186**, 701-709.
- Hubbard, M.J., Cohen, P. (1989b): Regulation of protein phosphatase-1<sub>G</sub> from rabbit skeletal muscle. 2. Catalytic subunit translocation is a mechanism for reversible inhibition of activity toward glycogen-bound substrates. *Eur. J. Biochem.* **186**, 711-716.
- Hubbard, M.J., Cohen, P. (1993): On target with a new mechanism for the regulation of protein phosphorylation. *trends in Biochemical Sciences* **18**, 172-177.
- Hubbard, M.J., Dent, P., Smythe, C., Cohen, P. (1990): Targetting of protein phosphatase 1 to the sarcoplasmic reticulum of rabbit skeletal muscle by a protein that is very similar or identical to the G subunit that directs the enzyme to glycogen. *Eur. J. Biochem.* **189**, 243-249.
- Ingebritsen, T.S., Cohen, P. (1983): Protein phosphatases: properties and role in cellular regulation. *Science* **221**, 331-337.
- Ito, M., Feng, J., Tsujino, S., Inagaki, N., Inagaki, M., Tanaka, J., Ichikawa, K., Hartshorne, D.J., Nakano, T. (1997): Interaction of smooth muscle myosin phosphatase with phospholipids. *Biochemistry* **36**, 7607-7614.
- Jagiello, I., Beullens, M., Vulsteke, V., Wera, S., Sohlberg, B., Stalmans, W., von Gabain, A., Bollen, M. (1997): NIPP-1, a nuclear inhibitory subunit of protein phosphatase-1, has RNA-binding properties. *The Journal of Biological Chemistry* **272**, 22067-22071.
- Johansen, J.W., Ingebritsen, T.S. (1986): Phosphorylation and inactivation of protein phosphatase 1 by pp60<sup>v-src</sup>. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 207-211.
- Kamata, T., Subleski, M., Hara, Y., Yuhki, N., Kung, H.-F., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., Yoshimura, T., Modi, W., Copeland, T.D. (1998): Isolation and characterization of a bovine neural specific protein (CRMP-2) cDNA homologous to *unc-33*, a *C. elegans* gene implicated in axonal outgrowth and guidance. *Molecular Brain Research* **54**, 219-236.
- Kimura, K., Ito, M., Amano, M., Chihara, K., Fukata, Y., Nakafuku, M., Yamamori, B., Feng, J., Nakano, T., Okawa, K., Iwamatsu, A., Kaibuchi, K. (1996): Regulation of myosin phosphatase by rho and rho-associated kinase (rho-kinase). *Science* **273**, 245-248.

- Klumpp, S., Selke, D., Fischer, D., Baumann, A., Müller, F., Thanos, S. (1998a): Protein phosphatase type-2C isozymes present in vertebrate retinæ: Purification, characterization, and localization in photoreceptors. *Journal of Neuroscience Research* **51**, 328-338.
- Klumpp, S., Selke, D., Hermesmeier, J. (1998b): Protein phosphatase type 2C active at physiological  $Mg^{2+}$ : stimulation by unsaturated fatty acids. *FEBS Letters* **437**, 229-232.
- Kutuzov, M.A., Andreeva, A.V., Pages, F., Bennett, N. (1998): Ser/Thr-phosphatases of bovine retina: Detection of cDNA encoding the catalytic subunit PP2B of  $\gamma$ -Isoform and two rdgC/PPEF homologues. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry* **24**, 133-134.
- Kyhse-Andersen, J. (1984): Electrophoretic transfer of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* **10**, 203-209.
- Laemmli, U.K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Liu, X., Udovichenko, I.P., Brown, S.D.M., Steel, K.P., Williams, D.S. (1999): Myosin VIIa participates in opsin transport through the photoreceptor cilium. *The Journal of Neuroscience* **19**, 6267-6274.
- Liu, X.R., Vansant, G., Udovichenko, I.P., Wolfrum, U., Williams, D.S. (1997): Myosin VIIa, the product of the Usher 1B syndrome gene, is concentrated in the connecting cilia of photoreceptor cells. *Cell Motility & Cytoskeleton* **37**, 240-252.
- MacMillan, L.B., Bass, M.A., Cheng, N., Howard, E.F., Tamura, M., Strack, S., Wadzinski, B.E., Colbran, R.J. (1999): Brain actin-associated protein phosphatase 1 holoenzymes containing spinophilin, neurabin, and selected catalytic subunit isoforms. *The Journal of Biological Chemistry* **274**, 35845-35854.
- McAvoy, T., Allen, P.B., Obaishi, H., Nakanishi, H., Takai, Y., Greengard, P., Nairn, A.C., Hemmings, H.C. (1999): Regulation of neurabin I interaction with protein phosphatase 1 by phosphorylation. *Biochemistry* **38**, 12943-12949.
- Molday, R.S. (1998): Photoreceptor membrane proteins, phototransduction, and retinal degenerative diseases. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* **39**, 2493-2513.

- Momayezi, M., Wloga, D., Kissmehl, R., Plattner, H., Jung, G., Klumpp, S., Schultz, J.E. (1996): Immunolocalization of protein phosphatase type 1 in *Paramecium* cells using antibodies against recombinant protein and peptides. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry* **44**, 891-905.
- Moorhead, G., Johnson, D., Morrice, N., Cohen, P. (1998): The major myosin phosphatase in skeletal muscle is a complex between the  $\beta$ -isoform of protein phosphatase 1 and the MYPT2 gene product. *FEBS Letters* **438**, 141-144.
- Muresan, V., Bendala-Tufanisco, E., Hollander, B.A., Besharse, J.C. (1997): Evidence for kinesin-related proteins associated with the axoneme of retinal photoreceptors. *Experimental Eye Research* **64**, 895-903.
- Nakanishi, H., Obaishi, H., Satoh, A., Wada, M., Mandai, K., Satoh, K., Nishioka, H., Matura, Y., Mizoguchi, A., Takai, Y. (1997): Neurabin: A novel neural tissue-specific actin filament-binding protein involved in neurite formation. *The Journal of Cell Biology* **139**, 951-961.
- Neuhoff, V., Arold, N., Taube, D., Ehrhardt, W. (1988): Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis* **9**, 255-262.
- Pagh-Roehl, K., Burnside, B. (1995): Preparation of teleost rod inner and outer segments. *Methods in Cell Biology* **47**, 83-92.
- Peters, C., Andrews, P.D., Stark, M.J.R., Cesaro-Tadic, S., Glatz, A., Podtelejnikov, A., Mann, M., Mayer, A. (1999): Control of the terminal step of intracellular membrane fusion by protein phosphatase 1. *Science* **285**, 1084-1087.
- Pinna, L.A., Donella-Deana, A. (1994): Phosphorylated synthetic peptides as tools for studying protein phosphatases. *Biochimica et Biophysica Acta* **1222**, 415-431.
- Printen, J.A., Brady, M.J., Saltiel, A.R. (1997): PTG, a protein phosphatase 1-binding protein with a role in glycogen metabolism. *Science* **275**, 1475-1478.
- Quinn, C., Gray, G.E., Hockfield, S. (1999): A family of proteins implicated in axon guidance and outgrowth. *Journal of Neurobiology* **41**, 158-164.

- Satoh, A., Nakanishi, H., Obaishi, H., Wada, M., Takahashi, K., Satoh, K., Hirao, K., Nishioka, H., Hata, Y., Mizoguchi, A., Takai, Y. (1998): Neurabin-II/Spinophilin. An actin filament-binding protein with one PDZ domain localized at cadherin-based cell-cell adhesion sites. *The Journal of Biological Chemistry* **273**, 3470-3475.
- Schägger, H., Cramer, W.A., von Jagow, G. (1994): Analysis of molecular masses and oligomeric states of protein complexes by blue native electrophoresis and isolation of membrane protein complexes by two-dimensional native electrophoresis. *Analytical Biochemistry* **217**, 220-230.
- Schillace, R.V., Scott, J.D. (1999): Association of the type 1 protein phosphatase PP1 with the A-kinase anchoring protein AKAP220. *Current Biology* **9**, 321-324.
- Schmidt, P.H., Dransfield, D.T., Claudio, J.O., Hawley, R.G., Trotter, K.W., Milgram, S.L., Goldenring, J.R. (1999): AKAP350, a multiply spliced protein kinase A-anchoring protein associated with centrosomes. *The Journal of Biological Chemistry* **274**, 3055-3066.
- Schnetkamp, P.P.M., Daemen, F.J.M. (1982): Isolation and characterization of osmotically sealed bovine rod outer segments. *Methods in Enzymology* **81**, 110-116.
- Sim, A.T., Ratcliffe, E., Mumby, M.C., Villa-Moruzzi, E., Rostas, J.A. (1994): Differential activities of protein phosphatase types 1 and 2A in cytosolic and particulate fractions from rat forebrain. *Journal of Neurochemistry* **62**, 1552-1559.
- Sim, A.T.R., Scott, J.D. (1999): Targeting of PKA, PKC and protein phosphatases to cellular microdomains. *Cell Calcium* **26**, 209-217.
- Smith, F.D., Oxford, G.S., Milgram, S.L. (1999): Association of the D2 dopamine receptor third cytoplasmic loop with spinophilin, a protein phosphatase-1-interacting protein. *The Journal of Biological Chemistry* **274**, 19894-19900.
- Somlyo, A.P., Somlyo, A.V. (2000): Signal transduction by G-proteins, Rho-kinase and protein phosphatase to smooth muscle and non-muscle myosin II. *Journal of Physiology* **522.2**, 177-185.
- Steinberg, R.H., Fisher, S.K., Anderson, D.H. (1980): Disc morphogenesis in vertebrate photoreceptors. *The Journal of Comparative Neurology* **190**, 501-518.

- Strålfors, P., Hiraga, A., Cohen, P. (1985): The protein phosphatases involved in cellular regulation. Purification and characterization of the glycogen-bound form of protein phosphatase-1 from rabbit skeletal muscle. *Eur. J. Biochem.* **149**, 295-303.
- Strack, S., Kini, S., Ebner, F.F., Wadzinski, B.E., Colbran, R.J. (1999): Differential cellular and subcellular localization of protein phosphatase 1 isoforms in brain. *The Journal of Comparative Neurology* **413**, 373-384.
- Surks, H.K., Mochizuki, N., Kasai, Y., Georgescu, S.P., Tang, K.M., Ito, M., Lincoln, T.M., Mendelsohn, M. (1999): Regulation of myosin phosphatase by a specific interaction with cGMP-dependent protein kinase I $\alpha$ . *Science* **286**, 1583-1587.
- Takahashi, M., Shibata, H., Shimakawa, M., Miyamoto, M., Mukai, H., Ono, Y. (1999): Characterization of a novel giant scaffolding protein, CG-NAP, that anchors multiple signaling enzymes to centrosome and the golgi apparatus. *The Journal of Biological Chemistry* **274**, 17267-17274.
- Tang, P.M., Bondor, J.A., Swiderek, K.M., DePaoli-Roach, A.A. (1991): Molecular cloning and expression of the regulatory (R<sub>GI</sub>) subunit of the glycogen-associated protein phosphatase. *The Journal of Biological Chemistry* **266**, 15782-15789.
- Terry-Lorenzo, R.T., Inoue, M., Connor, J.H., Haystead, T.A.J., Armbruster, B.N., Gupta, R.P., Oliver, C.J., Shenolikar, S. (2000): Neurofilament-L is a protein phosphatase-1-binding protein associated with neuronal plasma membrane and post-synaptic density. *The Journal of Biological Chemistry* **275**, 2439-2446.
- Vulsteke, V., Beullens, M., Waelkens, E., Stalmans, W., Bollen, M. (1997): Properties and phosphorylation sites of baculovirus-expressed nuclear inhibitor of protein phosphatase-1 (NIPP-1). *The Journal of Biological Chemistry* **272**, 32972-32978.
- Walker, K.S., Watt, P.W., Cohen, P. (2000): Phosphorylation of the skeletal muscle glycogen-targeting subunit of protein phosphatase 1 in response to adrenaline in vivo. *FEBS Letters* **466**, 121-124.
- Wang, L.-H., Strittmatter, M. (1996): A family of rat CRMP genes is differentially expressed in the nervous system. *The Journal of Neuroscience* **16**, 6197-6207.

- Wang, L.-H., Strittmatter, S.M. (1997): Brain CRMP forms heterotetramers similar to liver dihydropyrimidinase. *Journal of Neurochemistry* **69**, 2261-2269.
- Wera, S., Hemmings, B.A. (1995): Serine/threonine protein phosphatases. *Biochemical Journal* **311**, 17-29.
- Westphal, R.S., Tavalin, S.J., Lin, J.W., Alto, N.M., Fraser, I.D.C., Langeberg, L.K., Sheng, M., Scott, J.D. (1999): Regulation of NMDA receptors by an associated phosphatase-kinase signaling complex. *Science* **285**, 93-96.
- Williams, D.S., Hallett, M.A., Arikawa, K. (1992): Association of myosin with the connecting cilium of rod photoreceptors. *Journal of Cell Science* **103**, 183-190.
- Wolfrum, U. (1995): Centrin in the photoreceptor cells of mammalian retinæ. *Cell Motility & Cytoskeleton* **32**, 55-64.
- Wolfrum, U. (1998): Unkonventionelle ciliäre Cytoskelettelemente in Sinneszellen von Vertebraten. Habilitationsschrift der Fakultät Bio- und Geowissenschaften der Universität Karlsruhe.
- Wolfrum, U., Liu, X., Schmitt, A., Udovichenko, I.P., Williams, D.S. (1998): Myosin VIIa as a common component of cilia and microvilli. *Cell Motility & Cytoskeleton* **40**, 261-271.
- Wolfrum, U., Salisbury, J.L. (1998): Expression of centrin isoforms in the mammalian retina. *Experimental cell research* **242**, 10-17.
- Wolfrum, U., Schmitt, A. (1999): Evidence for myosin VIIa-driven transport of rhodopsin in the plasma membrane of the photoreceptor-connecting cilium. In: Hollyfield, J.G., Andersson, R.E., La Vail, M. (Herausgeber). *Retinal Degenerative Diseases and Experimental Therapy*. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, 3-14.
- Wolfrum, U., Schmitt, A. (2000): Rhodopsin transport in the membrane of the connecting cilium of mammalian photoreceptor cells. *Cell Motility & Cytoskeleton* **46**, 95-107.
- Yan, C., Hsieh-Wilson, L., Feng, J., Tomizawa K., Allen, P.B., Fienberg, A.A., Nairn, A.C., Greengard, P. (1999): Protein phosphatase 1 modulation of neostriatal AMPA channels: regulation by DARPP-32 and spinophilin. *nature neuroscience* **1**, 13-17.
- Yang, P., Fox, L., Colbran, R.J., Sale, W.S. (2000): Protein phosphatases PP1 and PP2A are located in distinct positions in the chlamydomonas flagellar axoneme. *Journal of Cell Science* **113**, 91-102.

- Zhang, J., Zhang, L., Zhao, S., Lee, E.Y.C. (1998): Identification and characterization of the human HCG V gene product as a novel inhibitor of protein phosphatase-1. *Biochemistry* **37**, 16728-16734.
- Zigmond, M.J., Bloom, F.E., Landis, S.C., Roberts, J.L., Squire, L.R. (1999): fundamental neuroscience. Academic Press.



## 9 Anhang

### Veröffentlichungen

#### Abstracts

Grumann, A., Schmitt, A., Wolfrum, U., Klumpp, S. (1999): Protein phosphatase type-1 in the connecting cilium of bovine retina. *Biological Chemistry* 380, Special Supplement

Grumann, A., Schmitt, A., Wolfrum, U., Klumpp, S. (2000): Protein phosphatase type-1 associated with the ciliary axoneme of mammalian photoreceptor cells. *European Journal of Cell Biology* 79, Supplement 50

#### Poster

Grumann, A., Schmitt, A., Wolfrum, U., Klumpp, S. (1999): Protein phosphatase type-1 in the connecting cilium of bovine retina. Herbsttagung der Gesellschaft für Biochemie und Molekularbiologie in Hamburg (5. – 8. September 1999)

Grumann, A., Schmitt, A., Wolfrum, U., Klumpp, S. (2000): Protein phosphatase type-1 associated with the ciliary axoneme of mammalian photoreceptor cells. 24th Annual Meeting of the German Society for Cell Biology in Karlsruhe (26. – 30. März 2000)

## **Teilnahme an Kongressen**

7. – 11. Oktober 1997	Third International Dahlem Symposium on “Cellular signal recognition and transduction” in Berlin
4./5. September 1999	Jahrestagung der Studiengruppe Neurochemie der Gesellschaft für Biochemie und Molekularbiologie in Hamburg
5. – 8. September 1999	Herbsttagung der Gesellschaft für Biochemie und Molekularbiologie in Hamburg
26. – 30. März 2000	24th Annual Meeting of the German Society for Cell Biology in Karlsruhe
23. – 26. Juli 2000	8th International Symposium on Pharmacology of Cerebral Ischemia in Marburg
4. – 9. November 2000	30th Annual Meeting of the Society for Neuroscience in New Orleans

## **Teilnahme an Schwerpunktprogrammen der DFG**

26. – 29. April 1998	1. Kolloquium „Molekulare Sinnesphysiologie“ in Günzburg
14. – 17. März 1999	2. Kolloquium „Molekulare Sinnesphysiologie“ in Günzburg

---

## Lebenslauf

7. Oktober 1971	Geburt in Varel/Oldenburg
1978 bis 1982	Besuch der Grundschule
1982 bis 1984	Besuch der Orientierungsstufe
1984 bis 1991	Besuch des Lothar-Meyer-Gymnasiums
28. Mai 1991	Zeugnis der allgemeinen Hochschulreife
Juli 1991 bis Juni 1992	Ableistung des Grundwehrdienstes
Oktober 1992 bis Juli 1996	Studium der Pharmazie an der Philipps-Universität in Marburg
August/September 1994	Erster Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
September/Oktober 1996	Zweiter Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
November 1996 bis April 1997	Praktische Ausbildung in der Kosmas-Apotheke in Köln
Mai 1997 bis Oktober 1997	Praktische Ausbildung am Institut für Pharmazeutische Chemie, Abteilung Biochemie der Philipps-Universität Marburg
17. November 1997	Dritter Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
25. November 1997	Erteilung der Approbation als Apotheker
Mai 1997 bis Juni 2000	Experimentelle Arbeiten zur vorliegenden Dissertation „Die Protein-Phosphatase $\text{Typl}\gamma\text{l}$ in der Retina – Identifizierung und subzelluläre Lokalisierung“ am Institut für Pharmazeutische Chemie, Abteilung Biochemie der Philipps-Universität Marburg unter Anleitung von Frau Prof. Dr. Susanne Klumpp